

PCT/EP04/08624



**Bescheinigung**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten Internationalen Patentanmeldung überein.

**Certificate**

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

**Attestation**

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

06. 10. 2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

Mirella DELEYF

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09106

**BEST AVAILABLE COPY**

Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

in Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Deutschland  
Ort: Deutschland  
Pays: Deutschland

Tag: 13. November 2002  
Date: 13. November 2002  
Date: (13.11.2002)

Aktenzeichen: 10253112.9  
File no.  
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

Weitere Anmelder:  
4. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)  
5. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002  
(16.12.2002)

10258971.2

**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

## PCT-ANTRAG

0000054058

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 06.08.2003 11:04:47 AM

V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>EP: AT BE BG CH&amp;LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist</p>
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&amp;LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW</p>
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 and V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmelde datum	13 November 2002 (13.11.2002)
VI-1-2	Nummer	10253112.9
VI-1-3	Staat	DE

## Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

## Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10 Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und

15 Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der 20 Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von 25 gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Proteinsequenzen sind aus verschiedenen Organismen isoliert und annotiert worden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, 35 Accession NO: D58420), aus *Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422), *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-

144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112), *Synechocystis sp. Strain PC6803* (Accession NO: NP\_442491), *Bradyrhizobium sp.* (Accession NO: AF218415) und *Nostoc sp. PCC 7120* (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 5 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888).

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtW) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes sp. PC-1* in Mikroorganismen.

10 Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwara et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352) und Hirschberg et al.(FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (crtW, crtO oder bkt) in *E. coli* herzustellen.

15 Hirschberg et al.(FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (crtO) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5), 551-55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

20 WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (crtO) in Tabak.

25 WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaftpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

30 Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen eine große Menge an hydroxylierten Nebenprodukten, wie beispielsweise Zeaxanthin und Adonixanthin liefern.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des

5 Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität

10 durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

15 Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage versetzt werden, Carotinoide wie beispielsweise  $\beta$ -

20 Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocarotinoiden wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, *Adonisröschen*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea* weisen bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

30 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Ketolaseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder

35 Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

5

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus verstanden.

25 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

35

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase

5 Aktivität aufweisen, vorzugsweise Blakeslea.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

10 Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

15 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßigen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den

25 Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der 35 Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise

durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNABindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von die-

ser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

5 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren

10 abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

● In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

15 In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

20 25 In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.

30 35 Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäuren, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser

Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

- 5 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu Ketocarotinoiden mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwendeten Ketolase-Gene.
- 10 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die 15 Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 20 Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

25

*Nostoc sp. Strain PCC7120* (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

- 30 *Nostoc punctiforme ATTC 29133*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 3); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 4) (als putatives Protein annotiert) oder

*Nostoc punctiforme ATTC 29133*, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 5), Protein: (SEQ ID NO: 6) (nicht annotiert),

35

*Synechococcus* sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 46), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 47) (als putatives Protein annotiert),

5 Nodularia spumigena NSOR10, (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 52, Protein: SEQ ID NO: 53)

oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen wie beispielsweise

10 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 8 oder 10 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 4 bzw. SEQ ID NO: 3 hervorgehen,

15 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder 14 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13, die beispielsweise durch Variation/Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 6 bzw. SEQ ID NO: 5 hervorgehen, oder

20 die Ketolasen der Sequenz SEQ ID NO: 49 oder 51 und die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 48 oder SEQ ID NO: 50, die beispielsweise durch Variation bzw. Mutation aus der Sequenz SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 46 hervorgehen.

25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 30 2 leicht auffinden.

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, 5 E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein 10 aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden. 15

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie 20 zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben: 25

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

30

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

35 (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

5

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

10 (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

(2) Waschschrifte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

15

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

20

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

25

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz

30 SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 75 %, bevorzugter mindestens 80 %, bevorzugter mindestens 85 %, bevorzugter mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 %, besonders bevorzugt mindestens 98 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution,

5 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure

10 eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

15 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

25 Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinkette verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci*. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty	10
30 Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
35 Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuple size 1

Gap penalty 3

5 Window size 5

Number of best diagonals 5

Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die 15 Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 65% auf.

Die Sequenz der zweiten Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATTC 29133 (SEQ ID NO: 20 6) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 58% auf.

Die Sequenz der Ketolase aus *Synechococcus sp. WH 8102* (SEQ ID NO: 47) weist mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) beispielsweise eine Identität von 44% auf.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich:

30 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, ent-haltend die Sequenz SEQ ID NO: 1, in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden eine Identität von 39% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 40% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und 20 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*; NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

5 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

15 Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

20 Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

25 Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw.  $\gamma$ -Carotin oder die gebildete Menge an  $\gamma$ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an  $\beta$ -Carotin aus  $\gamma$ -Carotin erhöht.

30

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt min-

destens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie  $\beta$ -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.); Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma- protein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

5 Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der An-  
satz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organis-  
musextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika,  
0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in  
10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium  
10 gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zu-  
gabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reakti-  
onsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

15 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sand-  
mann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

20 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch ver-  
schiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regula-  
tionsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Ge-  
nexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nuklein-  
säuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.

25 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase,  
und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -  
Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen,  
beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens  
durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-  
Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer  
30 Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure,  
kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase  
und/oder  $\beta$ -Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der  
Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

5

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

10

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

15

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNABindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, in den Organismus.

25

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase kodiert, verwendet werden.

30 Bei genomischen Hydroxylase- bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

35

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein: SEQ ID NO: 16).

5 Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres

10 Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

● In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder 15 mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion

20 oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase 25 aufweisen.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der

30 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 16 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 15 aus verschiedenen Organis-

men deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der

5 Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 16.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus- spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 15, in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform  
20 als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäure- sequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzug- ter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit  
25 der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase aufweisen.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend  
30 beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entspre- chenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 18 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispiels-  
35 weise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen,

deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

20 Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamidit-methode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die 25 Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Kle-now-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klo-nierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organismen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen und

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder  
5 verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  
 $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu  
10 zwei oder drei der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

● Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind,  
15 Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits  
20 eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

● 25 Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringsens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,  
30 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534,

das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrophous* oder *Phaffia rhodzyma*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus pluvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iiliaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Phytolacca*, *Potentilla*, *Pyracantha*,

*Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa,

5 Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum oder Adonis.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der 10 Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder

15 Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

20 Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder

25 LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promoters. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

30

Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannte Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

35

Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

5

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie

10 Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

15 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin,

20 Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

25 Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

35 Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzugte Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter,

Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens

5 verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blüten spezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die

10 vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blüten spezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

In einer weiteren, besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die

20 vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

25 In einer weiteren, besonderen bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die

30 vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

35 Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transitpeptid.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

5 Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

10 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

15 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

20 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

25 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulatorische Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatoriver Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

5 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus

10 (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

● Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

15 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen

20 Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-

● 25 Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698 , Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

30 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc

Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hille-

5 brand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol

10 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) 15 Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress indu-

20 zierte werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

25 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon 30 (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Mattton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. 35 (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992)

5 Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promoto-

10 ren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die ge-  
● webespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß  
entwicklungsabhängig erfolgt.

15 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Ge-  
weben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von  
Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise  
Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blät-  
ter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

20 Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der  
Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kar-  
toffel.

● 5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen  
FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco  
(Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel  
(Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

30 Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor  
(WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter  
aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific  
carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus *Cucumis sativus* Acc.-No.  
AF099501, Basenpaar 1 bis 1532), der EPSP\_Synthase Promotor (5-enol-  
35 pyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No.  
M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene pro-

moter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

5

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

15

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20 Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blüten- und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blüten- und insbesondere blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie 35 einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

10 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

15 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent 20 abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

25 pTP09  
KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCT  
GTTCTGTCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCTCT  
30 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGC-  
GATTCTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGG-  
GATCC\_BamHI

35 pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-  
 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCGCCG-  
 TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTGTAAGGTACCGGC-  
 5 GATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAAGTGA  
 GACTGCGCTGATCC\_BamHI

pTP11

10 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCTC  
 GTTCTGTCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-  
 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCGCCG-  
 TACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTGTAAGGTACCGGC-  
 GATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAAGTGA  
 15 GACTGCGGGGATCC\_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabisopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-  
 20 Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons  
 30 können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise  
 35 in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist.

Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann so-

10 wohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

15

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

25

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

30

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

35

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-

Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation  
5 bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von  
Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen  
Transformation genutzt werden.

10 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation  
durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren  
mit der Genkanone – die sogenannte “particle bombardment” Methode, die Elektroporation,  
die Inkubation trackener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion  
15 und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die  
genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene  
Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von  
S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev.  
Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

20 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan  
et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3,  
pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

25 Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

30 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu  
35 werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen ver-

wendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

5 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein 10 in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor 15 gebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

20 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl 25 in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen gentisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

30 Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Ver-

5 knüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

10 Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

15 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale 20 vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

25

Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trptet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren

30 ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P<sub>i</sub>P<sub>i</sub>-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

- 5 Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.
- 10 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaftweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 15

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promoters mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase,  $\beta$ -Hydroxylase oder  $\beta$ -Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhaftweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre

DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

5        Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert

10      wird.

●        Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

15        20      Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYEPsec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFA (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

●        25      Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

30        35      Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

●        35      Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

5 Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren 10 im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, 15 die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden.

20 Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

25 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen  $\lambda$  oder andere temperante Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet 30 ein Expressionssystem.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch 35 Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine

Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.

5 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

10 B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

● und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase

15 verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

20 Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von

25 mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

● In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogen Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbrings von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organis-

mus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*,

5 *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

● Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodzyma*.

15

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

20 Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

● Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

30 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

35 Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arni-*

*ca, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Gre-*

5 *villea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lili-um, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis,*

10 *Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussi-lago, Ulex, Viola oder Zinnia, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, Tropaeolum oder Adonis.*

15 Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon; Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Nar-cissus, Petunia, Geranium oder Tropaeolum, wobei die genetisch veränderte Pflanze 20 mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, - gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstel-lung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

30 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Or-ganismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch bei-spielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

5 Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

10

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese kodieren.

25 Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

30 35 Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Amino-

säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 6 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

● Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 47 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

20 Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenz SEQ ID NO: 5 enthält.

● 25 Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens

80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

5 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. 10 ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz 15 SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz 20 SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60 %, vorzugsweise mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter 35

mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße  
5 Verfahren eine höhere Menge an Ketocarotinoide, insbesondere Astaxanthin mit einer geringeren Menge an hydroxylierten Nebenprodukten.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

10 Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-  
15 DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1:  
Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NOST-Ketolase aus  
20 *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc sp. PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

25 Für die Präparation von genetischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc sp. PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc* PCC7120:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem

5 Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000  
10 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C  
15 gelöst.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc* sp. PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 19) und eines antisense-  
20 spezifischen Primers (NOSTG SEQ ID No. 20) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der

25 gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Nostoc* sp. PCC 7120 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 19)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 20)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
55°C 1 Minuten  
5 72°C 3 Minuten  
1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 19 und SEQ ID No. 20 resultierte in einem 805 Bp-Fragment; das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert 10 (SEQ ID No. 21). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte 15 eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 88,886-89,662 des Datenbankeneintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc sp. PCC 7120*.

20 Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 799 Bp SphI-Fragmentes aus pNOSTF-G und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc sp. PCC 7120* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit 25 dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

Beispiel 2:

Konstruktion des Plasmides pMCL-CrtYIBZ/idi/gps für die Synthese von Zeaxanthin in *E. coli*

30 Die Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps erfolgte in drei Schritten über die Zwischenstufen pMCL-CrtYIBZ und pMCL-CrtYIBZ/idi. Als Vektor wurde das mit high-copy-number Vektoren kompatible Plasmid pMCL200 verwendet (Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y. und Koga, T.; Construction of a series of pACYC-derived plasmid 35 vectors; Gene 162 (1995), 157-158).

## Beispiel 2.1.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ

Die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtZ* entstammen dem Bakterium *Erwinia uredovora* und wurden mittels PCR amplifiziert. Genomische DNA von *Erwinia uredovora* (DSM 30080) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche, Long Template PCR: Procedure for amplification of 5-20 kb targets with the expand long template PCR system). Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Biosynthesekusters von *Erwinia uredovora* waren die folgenden:

10

## Master Mix 1:

- 1.75  $\mu$ l dNTPs (Endkonzentration 350  $\mu$ M)
- 0.3  $\mu$ M Primer Crt1 (SEQ ID No. 22)
- 0.3  $\mu$ M Primer Crt2 (SEQ ID No. 23)
- 250 – 500 ng genomische DNA von DSM 30080

Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l

## Master Mix 2:

20

- 5  $\mu$ l 10x PCR Puffer 1 (Endkonzentration 1x, mit 1.75 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 10x PCR Puffer 2 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 10x PCR Puffer 3 (Endkonzentration 1x, mit 2.25 mM Mg<sup>2+</sup>)
- 0.75  $\mu$ l Expand Long Template Enzyme Mix (Endkonzentration 2.6 Units)

15

Aq. Dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l

Die beiden Ansätze "Master Mix 1" und "Master Mix 2" wurden zusammenpipetiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

1X 94°C 2 Minuten  
30X 94°C 30 Sekunden  
58°C 1 Minute  
68°C 4 Minuten  
35 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 22 und SEQ ID No. 23 resultierte in einem Fragment (SEQ ID NO: 24), das für die Gene *CrtY* (Protein: SEQ ID NO: 25), *CrtI* (Protein: SEQ ID NO: 26), *crtB* (Protein: SEQ ID NO: 27) und *CrtZ* (*i*DNA) kodiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-

5 Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-CrtYIBZ erhalten.

Das Plasmid pCR2.1-CrtYIBZ wurde Sall und HindIII geschnitten, das resultierende Sall/HindIII-Fragment isoliert und durch Ligierung in den Sall/HindIII geschnittenen Vektor pMCL200 transferiert. Das in pMCL 200 klonierte Sall/HindIII Fragment aus

10 pCR2.1-CrtYIBZ ist 4624 Bp lang, kodiert für die Gene *CrtY*, *CrtI*, *crtB* und *CrtZ* und entspricht der Sequenz von Position 2295 bis 6918 in D90087 (SEQ ID No. 24). Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ.

Beispiel 2.2.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi

15 Das Gen *idi* (Isopentenyldiphosphat-Isomerase; IPP-Isomerase) wurde aus *E. coli* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend das gesamte *idi* Gen mit *idi*-Promotor und Ribosomenbindestelle, wurde aus *E. coli* mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-idi SEQ ID No. 28) und eines antisense-spezifischen Primers (3'-idi SEQ ID No. 29) amplifiziert.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 1 ul einer *E. coli* TOP10- Suspension
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-idi (SEQ ID No. 28)
- 0.2 mM 3'-idi (SEQ ID No. 29)

30

- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul Aq. Dest

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

1X 94°C 2 Minuten  
20X 94°C 1 Minute  
62 °C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
5 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 679 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 30). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in 10 den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pCR2.1-idi erhalten.

● Sequenzierung des Klons pCR2.1-idi bestätigte eine Sequenz, die sich nicht von der publizierten Sequenz AE000372 in Position 8774 bis Position 9440 unterscheidet. Diese 15 Region umfaßt die Promotor-Region, die potentielle Ribosomenbindestelle und den gesamten "open reading frame" für die IPP-Isomerase. Das in pCR2.1-idi klonierte Fragment hat durch das Einfügen einer Xhol-Schnittstelle am 5'-Ende und einer Sall-Schnittstelle am 3'-Ende des *idi*-Gens eine Gesamtlänge von 679 Bp.

20 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung des *idi*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des Xhol/Sall-Fragments aus pCR2.1-idi und Ligierung in den Xhol/Sall geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi.

● 5 Beispiel 2.3.: Konstruktion von pMCL-CrtYIBZ/idi/gps

Das Gen *gps* (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase; ; GGPP-Synthase) wurde aus *Archaeoglobus fulgidus* mittels PCR amplifiziert. Die Nukleinsäure, kodierend *gps* aus *Archaeoglobus fulgidus*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (5'-gps SEQ ID No. 32) und eines anti-sense-spezifischen Primers (3'-gps SEQ ID No. 33) amplifiziert.

Die DNA von *Archaeoglobus fulgidus* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) innerhalb eines Service-Dienstes präpariert. Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein GGPP-Synthase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µl einer *Archaeoglobus fulgidus*-DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM 5'-gps (SEQ ID No. 32)
- 0.2 mM 3'-gps (SEQ ID No. 33)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94°C 2 Minuten
- 20X 94°C 1 Minute
- 56°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

20 Das mittels PCR und den Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit an sich bekannten Methoden aus dem Agarosegel eluiert und mit den Restriktionsenzymen Ncol und HindIII geschnitten. Daraus resultiert ein 962 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 34). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Ncol/HindIII geschnittene Amplifikat in den Vektor pCB97-30 kloniert und der Klon pCB-gps erhalten.

30 Sequenzierung des Klons pCB-gps bestätigte eine Sequenz für die GGPP-Synthase aus *A. fulgidus*, die sich von der publizierten Sequenz AF120272 in einem Nukleotid unterscheidet. Durch das Einfügen einer Ncol-Schnittstelle im *gps*-Gen wurde das zweite Kodon der GGPP-Synthase verändert. In der publizierten Sequenz AF120272 kodiert CTG (Position 4-6) für Leucin. Durch die Amplifikation mit den beiden Primern SEQ ID No. 32 und SEQ ID No. 33 wurde dieses zweite Kodon in GTG verändert, welches für Valin kodiert.

Der Klon pCB-gps wurde daher für die Klonierung des *gps*-Gens in den Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des KpnI/Xhol-Fragmentes aus pCB-gps und Ligierung in den KpnI und Xhol geschnittenen Vektor pMCL-CrtYIBZ/idi. Das klonierte KpnI/Xhol-Fragment (SEQ ID No. 34) trägt den

5 Prnr16-Promotor zusammen mit einer minimalen 5'-UTR-Sequenz von *rbcL*, den ersten 6 Kodons von *rbcL*, die die GGPP-Synthase N-terminal verlängern, und 3' vom *gps*-Gen die *psbA*-Sequenz. Der N-Terminus der GGPP-Synthase hat somit anstelle der natürlichen Aminosäure-Abfolge mit Met-Leu-Lys-Glu (Aminosäure 1 bis 4 aus AF120272) die veränderte Aminosäure-Abfolge Met-Thr-Pro-Gln-Thr-Ala-Met-Val-Lys-  
10 Glu. Daraus resultiert, dass die rekombinante GGPP-Synthase, beginnend mit Lys in Position 3 (in AF120272) identisch ist und keine weiteren Änderungen in der Aminosäuresequenz aufweist. Die *rbcL*- und *psbA*-Sequenzen wurden gemäß einer Referenz  
● nach Eibl et al. (Plant J. 19. (1999), 1-13) verwendet. Der resultierende Klon heisst pMCL-CrtYIBZ/idi/gps.

15

Beispiel 3:

Biotransformation von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Zur Zeaxanthin-Biotransformation wurden rekombinante *E. coli*-Stämme hergestellt,  
20 welche durch heterologe Komplementation zur Zeaxanthin-Produktion befähigt sind. Stämme von *E. coli* TOP10 wurden als Wirtszellen für die Komplementationsexperimente mit den Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps verwendet.

Um *E. coli*-Stämme herzustellen, die die Synthese von Zeaxanthin in hoher Konzentration ermöglichen, wurde das Plasmid pMCL-CrtYIBZ/idi/gps konstruiert. Das Plasmid trägt die Biosynthesegene *crtY*, *crtB*, *crtI* und *crtY* von *Erwinia uredovora*, das Gen *gps* (für Geranylgeranylpyrophosphat-Synthetase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und das Gen *idi* (Isopentenyldiphosphat-Isomerase) aus *E. coli*. Mit diesem Konstrukt wurden limitierende Schritte für eine hohe Akkumulation von Carotinoiden und deren biosynthetischen Vorstufen beseitigt. Dies wurde zuvor von Wang et al. in ähnlicher Weise mit mehreren Plasmiden beschrieben (Wang, C.-W., Oh, M.-K. und Liao, J.C.; Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*, Biotechnology and Bioengineering 62 (1999), 235-241).

Kulturen von *E.coli* TOP10 wurden in an sich bekannter Weise mit den beiden Plasmiden pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformiert und in LB-Medium bei 30°C bzw. 37°C über Nacht kultiviert. Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopropyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in an sich üblicher Weise ebenfalls über

5 Nacht zugegeben.

Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten Stämmen wurden die Zellen mit Aceton extrahiert, das organische Lösungsmittel zur Trockne eingedampft und die Carotinoide mittels HPLC über eine C30-Säule aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

10 Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

15 Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
1.05	1.0	80.0	5.0	15.0
14.00	1.0	42.0	5.0	53.0
14.05	1.0	95.0	5.0	0
17.00	1.0	95.0	5.0	0
18.00	1.0	95.0	5.0	0

20

Detektion: 300 - 500 nm

Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Photodiodesarraydetektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

25

Abbildung 1 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit pNOSTF-G und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Es zeigt sich,

daß dieser Stamm aufgrund der heterologen Komplementation verschiedene Ketocarotinoide synthetisieren kann. Mit zunehmender Retentionszeit werden Astaxanthin (Peak 1), Adonirubin (Peak 2) und Canthaxanthin (Peak 3) eluiert.

5 Beispiel 3.1

Vergleichsbeispiel

Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde als Vergleichsbeispiel ein *E.coli*-Stamm hergestellt, der eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille exprimiert. Dazu wurde die cDNA die für die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert amplifiziert und gemäß Beispiel 1 in den gleichen Expressionsvektor kloniert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert. Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt; mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers PR1 (gcaagctcga cagctacaaa cc) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketoläse aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers PR2 (gaagcatgca gcttagcagcg acag) und eines antisense spezifischen Primers PR1 amplifiziert.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem 10 enthalten war:

- 4 ml einer Haematococcus pluvialis cDNA (hergestellt wie oben beschrieben).
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1
- 15 - 0.2 mM PR2
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94\_C 2 Minuten  
 35X 94\_C 1 Minute  
 53\_C 2 Minuten  
 25 72\_C 3 Minuten  
 1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert:

30	gaagcatgca gcttagcagcg acagtaatgt tggagcagct taccggaaac gctgaggcac	60
	tcaaggagaa ggagaaggag gttgcaggca gctctgacgt gttgcgtaca tggcgaccc	120
	agtactcgct tccgtcagag gagtcagacg cggccccccc gggactgaag aatgcctaca	180
35	agccaccacc ttccgacaca aagggcataca caatggcgct agctgtcatc ggctcctggg	240
	ccgcagtgtt cctccacgcc attttcaaa tcaagcttcc gaccccttg gaccagctgc	300
	actggctgcc cgtgtcagat gccacagctc agctggtag cggcagcagc agcctgctgc	360
	acatcgctgt agtattttt gtcctggagt tcctgtacac aggccctttt atcaccacgc	420
40	atgatgtat gcatggcacc atcgccatga gaaacaggca gcttaatgac ttcttggca	480
	gagttatgtat ctccttgcac gcctggttt attacaacat gctgcaccgc aagcattggg	540
	agcaccacaa ccacactggc gaggtggca aggaccctga cttccacagg gaaaccctg	600
	gcattgtgcc ctggtttgcc agcttcatgt ccagctacat gtcgtatgg cagttgcgc	660
	gcctcgcatg gtggacgggtg gtcatgcagc tgctgggtgc gccaatggcg aacctgctgg	720

tgttcatggc ggccgcgccc atcctgtccg cttccgctt gttctacttt ggcacgtaca	780
tgccccacaa gcctgagcct ggcgcgcgt caggcttc accagccgtc atgaactgg	840
5 ggaagtcgc cactagccag gcgtccgacc tggtcagctt tctgacctgc taccactcg	900
acttgtactg ggagcaccac cgtggccctt ttggcccttg gtgggagctg cccaaactg	960
gcccgtgtc tggccgaggt ctgggtcttg cctagctgg cacactgcag tggccctgc	1020
tgccagctgg gcatgcagg tttggcagga ctgggtgagg taaaagctg caggcgtgc	1080
tgccggacac gctgcatggg ctaccctgtg tagtggcgc cactagggg ggggtttgt	1140
agctgtcgag cttgc	

10

Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine 15 Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80.

20 Dieser Klon wurde für die Klonierung in den unter Beispiel 1 beschriebenen Expressionsvektor verwendet. Die Klonierung erfolgte analog wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Transformation der *E.coli* Stämme, deren Kultivierung und die Analyse des Carotinoidprofils erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.

25 Abbildung 2 zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus einem mit diesem Expressionsvektor und pMCL-CrtYIBZ/idi/gps transformierten *E. coli*-Stamm. Unter Verwendung einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*, wie beispielsweise in EP 725137 beschrieben, eluieren mit zunehmender Retentionszeit Astaxanthin (Peak 1), Adonixanthin (Peak 2) und nicht umgesetztes Zeaxanthin (Peak 3). Dieses Carotinoidprofil wurde bereits in EP 0725137 beschrieben.

30 Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der bakteriell produzierten Carotinoidmengen:

Tablelle 1: Vergleich der bakteriellen Ketocarotinoid-Synthese bei Verwendung zweier 35 verschiedener Ketolasen, der erfindungsgemäß NOST-Ketolase aus *Nostoc* sp. PCC7120 (Beispiel 3) und der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als Vergleichsbeispiel (Beispiel 3.1). Carotinoidmengen sind in ng/ ml Kulturflüssigkeit angegeben.

Ketolase aus	Astaxanthin	Adonirubin	Adonixanthin	Canthaxanthin	Zeaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow em. Wille (Vergleichsbeispiel)	13		102		738
<i>Nostoc sp. Strain</i> PCC7120	491	186		120	

Die erfindungsgemäße Expression der Ketolase aus *Nostoc sp. Strain PCC7120* führt zu einem Carotinoidmuster, welches sich von dem Carotinoidmuster nach Expression einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* deutlich unterscheidet. Während die Keto-

5 lase aus dem Stand der Technik nur sehr unvollständig das gewünschte Ketocarotinoid Astaxanthin liefert, ist Astaxanthin bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Ketolase das Hauptprodukt. Im erfindungsgemäßen Verfahren treten hydroxylierte Nebenprodukte in einer deutlich geringeren Menge auf.

10 Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NOST-Ketolase aus *Nostoc sp. PCC7120* in *L. esculentum* und in

15 *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

20

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-A (SEQ ID No.38) und FNR-B (SEQ ID No. 39) hergestellt.

25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR#1 ) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-A (SEQ ID No. 38)
- 0.2 mM FNR-B (SEQ ID No. 39)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10      1X    94°C 2 Minuten

●      35X   94°C 1 Minute  
          50°C 1 Minute  
          72°C 1 Minute

15      1X    72°C 10 Minuten

Das 647 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR#1 erhalten.

20      Sequenzierung des Klons pFNR#1 bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474; WO03/006660) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

● 25      pFNR wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30      Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 637 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR#1 (partialle SacI Hydrolyse) und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR#1 anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJITFNR.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 799 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor

pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

5 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3FNR:NOST (MSP101) wurde das 2.425 bp SacI-Xhol Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment *FNR-Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP Fragment* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase CDS* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Term* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

15 15 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

20 20 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNR:NOST (MSP102) wurde das 2.425 bp SacI-Xhol Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS Transit Peptide* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *Nost Ketolase* (777 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25 25 Beispiel 5:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc* sp. PCC 7120 NOST-Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

30 30 Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.41) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) hergestellt.

5

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 41)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

25 1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

30 Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert

und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung

5 des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 41) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 44) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 43) und AP3-2 (SEQ ID No. 42) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50  $\mu$ l Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

15

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 41 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 43)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 44 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 42)

20

- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25  $\mu$ l Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute

30

- 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind.

35

Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5 - 0.5 ug A1/4 Amplifikat  
- 0.25 ug A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10 - 17.6 ul A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 50 uM dNTPs  
- 2 ul 1X Klenow Puffer  
- 2U Klenow Enzym

15 Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 41) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 42) amplifiziert.

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25 - 1 ul Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)  
- 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM AP3-1(SEQ ID No. 41)  
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 42)  
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)  
30 - 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)  
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35 1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 41 (AP3-1) und SEQ ID No. 42 (AP3-2) resultierte in einem 777 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die

10 interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 767 Bp Sacl-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den Sacl-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 799 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJAP3PNOST.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3:NOST (MSP103) wurde das 2.555 bp Sacl-Xhol Fragment aus pJAP3NOST mit dem Sacl-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5, Konstrukt-karte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter (765 bp), Fragment rbcS TP 30 FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3:NOST (MSP104) wurde das 2.555 bp SacI-Xhol Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P PROMOTER den modifizierten AP3P Promoter (765 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOST KETOLASE CDS (777 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment 35S TERM (746 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

10

#### Beispiel 6

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP196-Ketolase aus  
15 *Nostoc punctiforme ATCC 29133* kodiert

Die DNA, die für die NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme ATCC 29133* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme ATCC 29133* (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert.

20 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme ATCC 29133*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l Na-MoO<sub>4</sub>·X2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

25

30 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nostoc punctiforme ATCC 29133*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Vo-

lumen) überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500  $\mu$ l Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß

5 überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25  $\mu$ l Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

10

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP196-1, SEQ ID No. 54) und eines antisense-spezifischen Primers (NP196-2 SEQ ID No. 55) amplifiziert.

15

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war

- 1  $\mu$ l einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 25 - 0.2 mM NP196-1 (SEQ ID No. 54)
- 0.2 mM NP196-2 (SEQ ID No. 55)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8  $\mu$ l Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

35 55°C 1 Minuten

72°C 3 Minuten  
1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 54 und SEQ ID No. 55 resultierte in einem 792

5 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP196, SEQ ID No. 56). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP196 erhalten.

10 Sequenzierung des Klons pNP196 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 140.571-139.810 des Datenbank- eintrages NZ\_AABC01000196 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Da- tenbankeintrag) mit der Ausnahme, daß G in Position 140.571 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in ei- 15 nem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

Dieser Klon pNP196 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117(Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

20 pJIT117 wurde modifiziert, indem der 35S-Terminator durch den OCS-Terminator (Oc- topine Synthase) des Ti-Plasmides pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Daten- bankeintrag X00493 von Position 12,541-12,350, Gielen et al. (1984) EMBO J. 3 835- 846) ersetzt wurde.

25 Das DNA-Fragment, das die OCS-Terminatorregion beinhaltet, wurde mittels PCR un- ter Verwendung des Plasmides pHELLSGATE (Datenbankeintrag AJ311874, Wesley et al. (2001) Plant J. 27 581-590, nach Standardmethoden aus *E.coli* isoliert) sowie der Primer OCS-1 (SEQ ID No. 58) und OCS-2 (SEQ ID No. 59) hergestellt.

30 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die die Octopin Synthase (OCS) Terminatorregion (SEQ ID No. 60) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten 35 waren:

- 100 ng pHELLSGATE plasmid DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM OCS-1 (SEQ ID No. 58)
- 0.2 mM OCS-2 (SEQ ID No. 59)
- 5 - 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 15 1X 72°C 10 Minuten

Das 210 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pOCS erhalten.

20 Sequenzierung des Klons pOCS bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf dem Ti-Plasmid pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankenbeitrag X00493) von Position 12.541 bis 12.350 übereinstimmt.

● 25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 210 bp Sall-Xhol Fragmentes aus pOCS und Ligierung in den Sall-Xhol geschnittenen Vektor pJIT117.  
Dieser Klon heisst pJO und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 782 Bp SphI-Fragmentes aus pNP196 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NP196-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP196.

## Beispiel 7:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

5 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem

10 15 Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

● Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No. 61) und FNR-2 (SEQ ID No. 62) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR (SEQ ID No. 20 63) beinhaltet, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 61)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 62)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
35 72°C 1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 652 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

5

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt.

10 Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp SmaI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den EcoRI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP196.

20 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transfor-  
mation der NP196-Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwen-  
dung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

5 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP105 wurde das 1.839 bp EcoRI-Xhol  
Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 li-  
giert (Abbildung 7, Konstruktakarte). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *FNR Pro-  
motor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transit-  
peptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die  
*Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-  
denylierungs signal von der Octopin-Synthase.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Tagetes-Expressionsvektors MSP106 wurde das 1.839 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstrukt-karte). In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 8:

10 Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*

15 Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

20 Das DNA Fragment, das die EPSPS Promoterregion (SEQ ID No. 66) aus *Petunia hybrida* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Petunia hybrida* isoliert) sowie der Primer EPSPS-1 (SEQ ID No. 64) und EPSPS-2 (SEQ ID No. 65) hergestellt.

25 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das EPSPS-Promoterfragment (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM EPSPS-1 (SEQ ID No. 64)
- 0.2 mM EPSPS-2 (SEQ ID No. 65)

35

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)

- 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5 1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute

72°C 2 Minute

1X 72°C 10 Minuten

10

Das 1773 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-

● Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pEPSPS erhalten.

Sequenzierung des Klons pEPSPS bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich durch  
15 zwei Deletion (Basen ctaagttcagga in Position 46-58 der Sequenz M37029; Basen  
aaaaat in Position 1422-1429 der Sequenz M37029) und die Basenaustausche (T  
statt G in Position 1447 der Sequenz M37029; A statt C in Position 1525 der Sequenz  
M37029; A statt G in Position 1627 der Sequenz M37029) von der publizierten EPSPS-  
Sequenz (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) unterscheidet. Die zwei  
20 Deletionen und die zwei Basenaustausche an den Positionen 1447 und 1627 der Se-  
quenz M37029 wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert  
und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten Petu-  
nia hybrida Pflanzen.

● 25 Der Klon pEPSPS wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196  
(in Beispiel 6 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus  
pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon,  
30 der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt  
pJOESP:NP196. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP196 in der kor-  
rekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-  
35 mation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus Nostoc punctiforme ATCC

29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP107 wurde das 2.961 KB bp SacI-Xhol

5 Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylie-  
10 rungssignal von Octopin-Synthase.

● Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-  
mation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes*  
erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP108 wurde das 2.961 KB bp SacI-Xhol  
Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte). In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid  
20 aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase , Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylie-  
rungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 9:

● 5 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

Die DNA, die für die NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type  
30 Culture Collection") amplifiziert. Die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde in Beispiel 19 beschrieben.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133  
35 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP195-1, SEQ ID No. 67) und eines antisense-spezifischen Primers (NP195-2 SEQ ID No. 68) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem ent-

5 halten war:

- 1 ul einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM NP195-1 (SEQ ID No. 67)
- 0.2 mM NP195-2 (SEQ ID No. 68)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35X 94°C 1 Minute  
20 55°C 1 Minuten  
72°C 3 Minuten  
1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 67 und SEQ ID No. 68 resultierte in einem 819  
5 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert  
(NP195, SEQ ID No. 69). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP195 erhalten.

30 Sequenzierung des Klons pNP195 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 55,604-56,392 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC010001965 identisch ist, mit der Ausnahme, daß T in Position 55.604 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reprodu-

ziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

Dieser Klon pNP195 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 809 Bp SphI-Fragmentes aus pNP195 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NP195-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP195.

10

Beispiel 10:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

15

Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

20

Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP195.

30

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP109 wurde das 1.866 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 li-

giert (Abbildung 11, Konstruktkarte). In der Abbildung 11 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* punctiforme in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

● Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP110 wurde das 1.866 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 12, Konstruktkarte). In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

20 Beispiel 11:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

● 25 Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

30 Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 10 beschrieben) verwendet.

35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp *SacI-HindIII* Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den *SacI-HindIII* geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst

pJOESP:NP195. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP111 wurde das 2.988 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 13, Konstruktakte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP* FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP112 wurde das 2.988 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktakte). In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP* FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 12:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 codiert.

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nodularia spumignea* NSOR10 amplifiziert.

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nodularia spumignea NSOR10*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l

5 EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

10 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nodularia spumignea NSOR10*:

● Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 15 10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

● 5 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nodularia spumignea NSOR10* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NODK-1, SEQ ID No. 71) und eines antisense-spezifischen Primers (NODK-2 SEQ ID No. 72) amplifiziert.

30 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ul einer *Nodularia spumignea* NSOR10 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NODK-1 (SEQ ID No. 71)
- 5 - 0.2 mM NODK-2 (SEQ ID No. 72)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

10 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 55°C 1 Minuten
- 15 72°C 3 Minuten
- 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 71 und SEQ ID No. 72 resultierte in einem 720 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert 20 (NODK, SEQ ID No. 73). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNODK erhalten.

● 35 Sequenzierung des Klons pNODK mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 2130-2819 des Datenbank-eintrages AY210783 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag). Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nodularia spumignea* NSOR10.

30 Dieser Klon pNODK wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 6 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 710 Bp SphI-Fragmentes aus pNODK und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NODK-Ketolase von *Nodularia spumignea* in der korrekten Orientie-

rung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONODK.

Beispiel 13:

5 Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR

10 (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

15

Der Klon pFNR (in Beispiel 7 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

20 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NODK.

25 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

30 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP113 wurde das 1.767 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 15, Konstruktakte). In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-35 denylierungssignal von der Octopin- Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* punctiforme in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP114 wurde das 1.767 bp EcoRI-Xhol Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 16, Konstruktkarte). In der Abbildung 16 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 14:

15 Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

20 Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al: 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

25 Der Klon pEPSPS (in Beispiel 8 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 12 beschrieben) verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp *SacI-HindIII* Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den *SacI-HindIII* geschnittenen Vektor pJ0NODK. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJOESP:NODK. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

35 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10*

in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO 02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP115 wurde das 2.889 KB bp SacI-Xhol

5 Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 17, Konstrukt-karte). In der Abbildung 17 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-  
10 denylierungssignal von Octopin-Synthase.

● Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transfor-

mation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea NSOR10* in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5

15 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP116 wurde das 2.889 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 18, Konstrukt-karte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment EPSPS den

20 EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polya-  
denylierungssignal von Octopin-Synthase.

25 Beispiel 15:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die

30 Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.

Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol.

35 Plant 15, 473-) mit 2% Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C bei wenig Licht (20 - 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen

quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5' - 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der

- 5 Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobakterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3FNR:NOST, pS3AP3:NOST, pS3FNR:NP196, pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3FNRNOST, pS3AP3NOST, pS3FNR:NP196, pS3EPS:NP196, pS3FNR:NP195, pS3EPS:NP195, pS3FNR:NODK und pS3EPS:NODK transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Über-
- 10 nachtkultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 °C kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3% Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt.
- 15 Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.
- 20 Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3% Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 - 100 µE, Lichtrhythmus 16h/8h) aufbewahrt. Aller zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 + 3% Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.
- 25

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Ex-

- 30 pressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3FNR:NOST wurde erhalten: MSP101-1, MSP101-2, MSP101-3

Mit pS3AP3:NOST wurde erhalten: MSP103-1, MSP103-2, MSP103-3

Mit pS3FNR:NP196 wurde erhalten: MSP105-1, MSP105-2, MSP105-3

Mit pS3EPS:NP196 wurde erhalten: MSP107-1, MSP107-2, MSP107-3

5 Mit pS3FNR:NP195 wurde erhalten: MSP109-1, MSP109-2, MSP109-3

Mit pS3EPS:NP195 wurde erhalten: MSP111-1, MSP111-2, MSP111-3

Mit pS3FNR:NODK wurde erhalten: MSP113-1, MSP113-2, MSP113-3

10 Mit pS3EPS:NODK wurde erhalten: MSP115-1, MSP115-2, MSP115-3

● Beispiel 16:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

15 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18-28°C/20-200 µE/3 - 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20-70 µE, für 4-8 Wochen.

20 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 - 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

25 Ein beliebiger *Agrobakterium tumefaciens* Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarken (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reporter-gene tragen kann wird (pS5FNR:NOST, pS5AP3:NOST, pS5FNR:NP196, pS5EPS:NP196, pS5FNR:NP195, pS5EPS:NP195, pS5FNR:NODK und pS5EPS:NODK), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 35 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und

derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 – 80 µMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 – 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sproßknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

30 Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 - 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert

werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

10 Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

● Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

20 Mit pS5FNR:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP102-1, MSP102-2, MSP102-3,

Mit pS5AP3:NOST wurde beispielsweise erhalten: MSP104-1, MSP104-2, MSP104-3

Mit pS5FNR:NP196 wurde erhalten: MSP106-1, MSP106-2, MSP106-3

25 Mit pS5EPS:NP196 wurde erhalten: MSP108-1, MSP108-2, MSP108-3

Mit pS5FNR:NP195 wurde erhalten: MSP110-1, MSP110-2, MSP110-3

30 Mit pS5EPS:NP195 wurde erhalten: MSP112-1, MSP112-2, MSP112-3

Mit pS5FNR:NODK wurde erhalten: MSP114-1, MSP114-2, MSP114-3

Mit pS5EPS:NODK wurde erhalten: MSP116-1, MSP116-2, MSP116-3

## Beispiel 17

## Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

## Beispiel 9.1

## 5 Trennung von Carotinoideestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

## Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörser

10 und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 ul).

Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100-200 ul Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie

15 (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrol-ether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoideestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

20 Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ul Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt.

Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg)

Flussrate: 1.0 ml/min

30 Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol

Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat

Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether

## Gradientprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
12.0	1.0	95.0	5.0	0
12.1	1.0	80.0	5.0	15.0
22.0	1.0	76.0	5.0	19.0
22.0	1.0	66.5	5.0	28.5
38.0	1.0	15.0	5.0	80.0
45.0	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0
46.1	1.0	95.0	5.0	0

Detektion: 300 - 500 nm

5 Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen wird gemörser und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide werden mittels TLC aufgetrennt. In den Linien können Mono- und Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester sind in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

## Beispiel 18

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

15 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörseretes Petalenmaterial (30-100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500ul; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 ul Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kalium-phosphatpuffer (100 mM, pH7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149  $\mu$ l einer NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl<sub>2</sub>). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37C inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird 595  $\mu$ l einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von Candida rugosa(Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595  $\mu$ l Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37C. Anschließend werden

etwa ca. 700 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O in der Lösung gelöst. Nach Zugabe von 1800 µl Petrolether werden die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase frablos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie

- 5 Carotinoide werden in 100-120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Ami-

nosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.

5

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Ursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, aufweisen.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in den Organismus einbringt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren

30

35

abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nuklein-säure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine  $\beta$ -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von die-  
10 ser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-  
leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und an-  
schließend die Ketocarotinoide aus den Organismen isoliert.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganis-  
mus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulie-  
rung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorga-  
nismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der *Gruppe Escherichia, Erwinia, Agrobacterium, Flavobac-  
terium, Alcaligenes, Paracoccus, Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synecho-  
cystis, Candida, Saccharomyces, Hansenula, Phaffia, Pichia, Aspergillus, Tri-*

*choderma, Ashbya, Neurospora, Blakeslea, Phycomyces, Fusarium, Haemato-*  
*coccus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella.*

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.

5

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.

10

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

20

25

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

30

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

5 A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

10 und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

15 26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

25 27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30 28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion

von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

5 10 30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.

15 15 31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.

20 20 32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.

25 33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakesleá*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.

35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Bras-

siceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iilliaceae oder Lamiaceae verwendet.

5

36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

10

20

37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.

25

38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.

30

39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 8 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 4 nicht enthalten ist.

35

40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 aufweist.

41. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 12 oder eine von 5 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäure- ebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 12 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 6 nicht enthalten ist.

10 42. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 49 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäure- ebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 49 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 47 nicht enthalten ist.

15 43. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 42, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 5 nicht enthalten ist.

44. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

25 45. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 6 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

30 46. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 47 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 47 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

35

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch veränderten Organismen

Zusammenfassung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

Abbildung 1

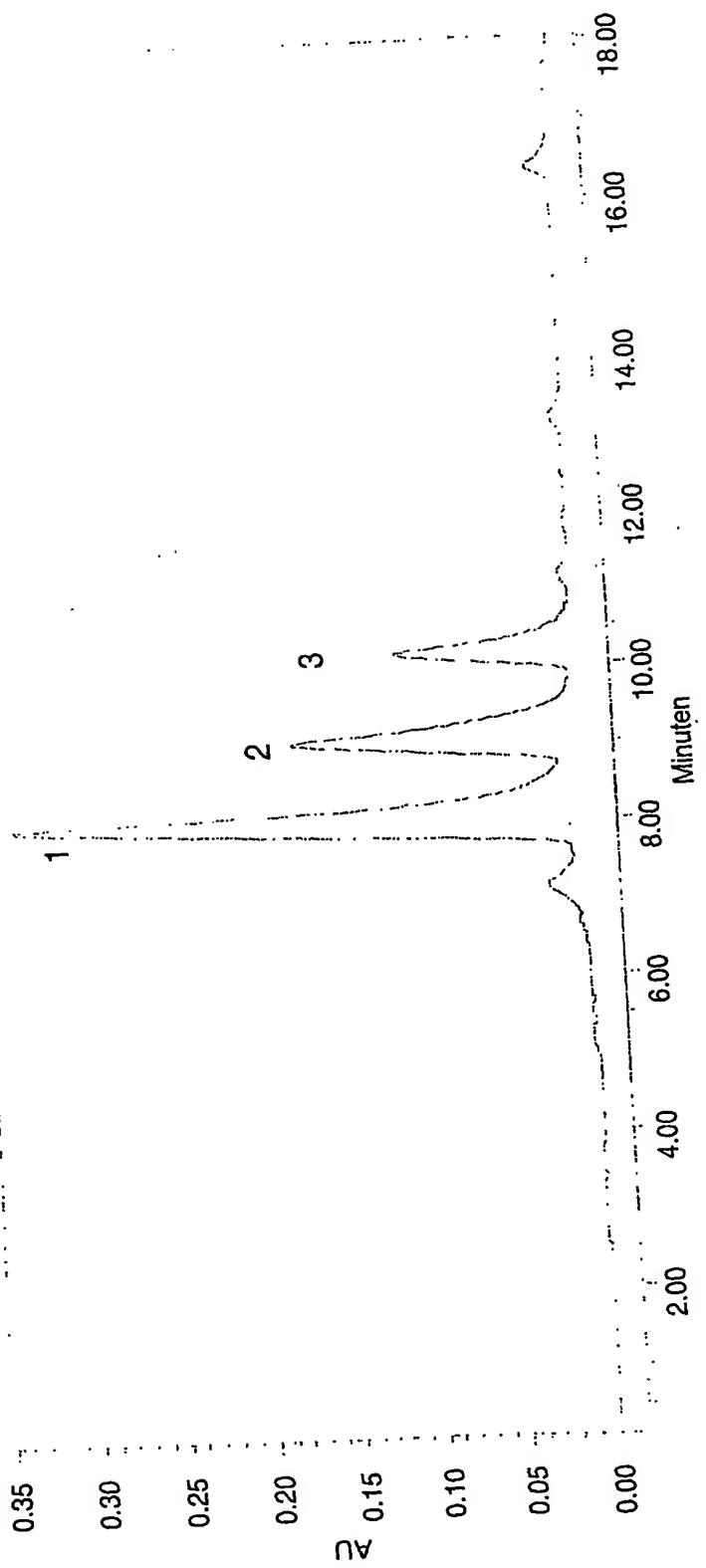
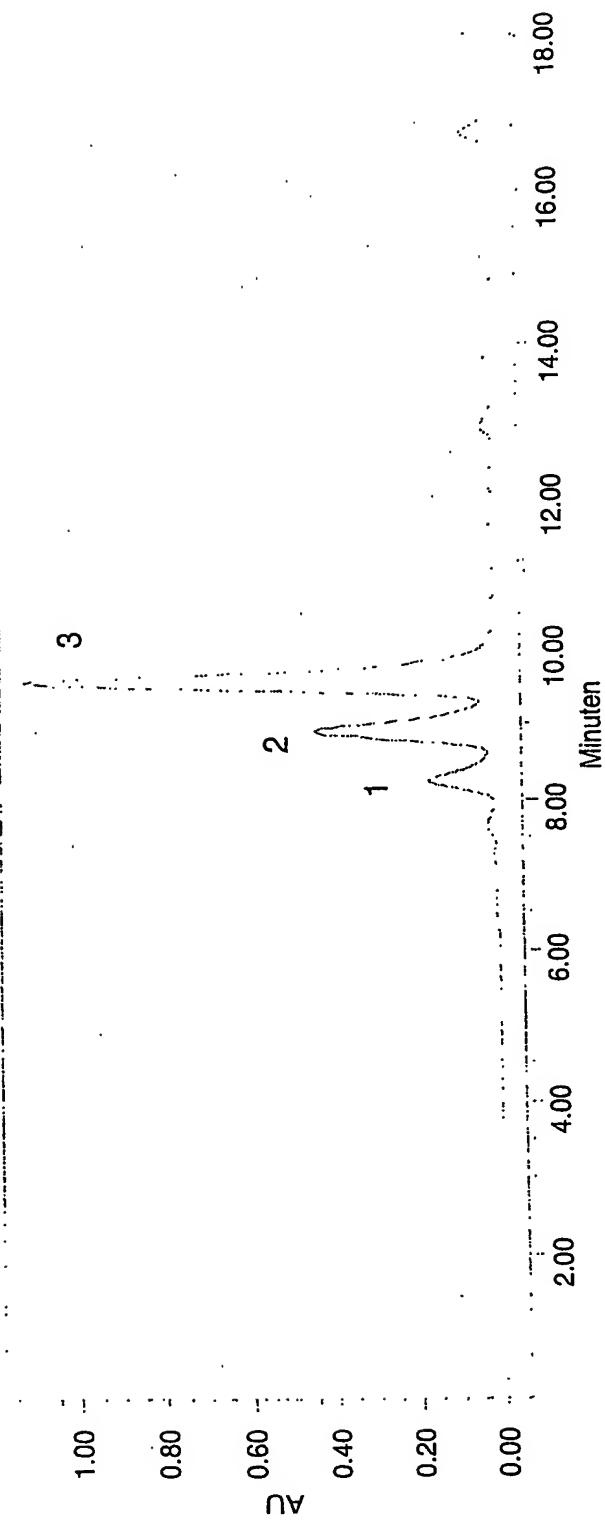


Abbildung 2



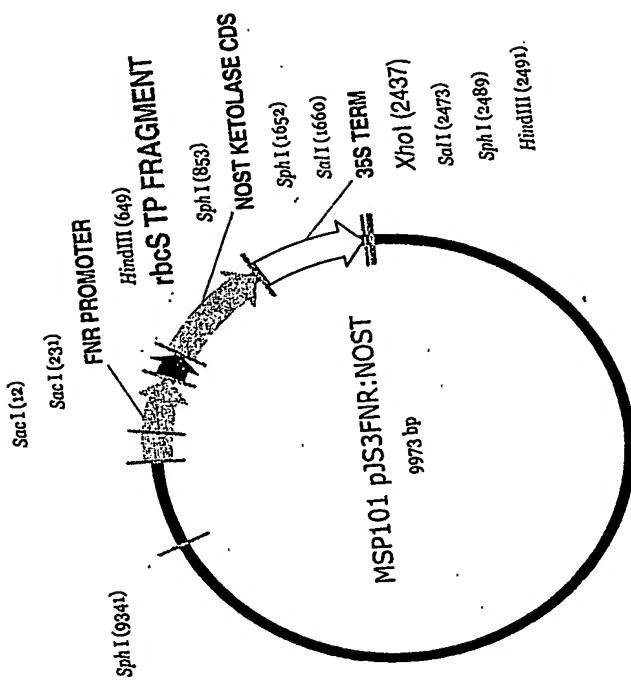


Abbildung 3

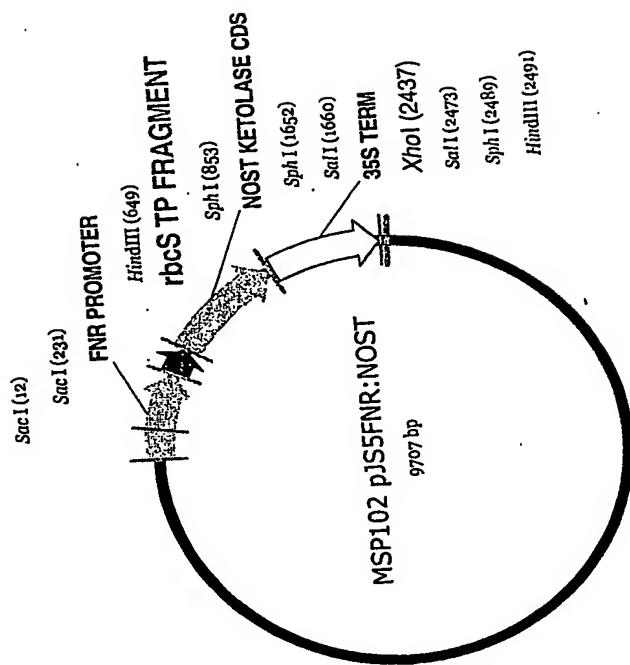


Abbildung 4

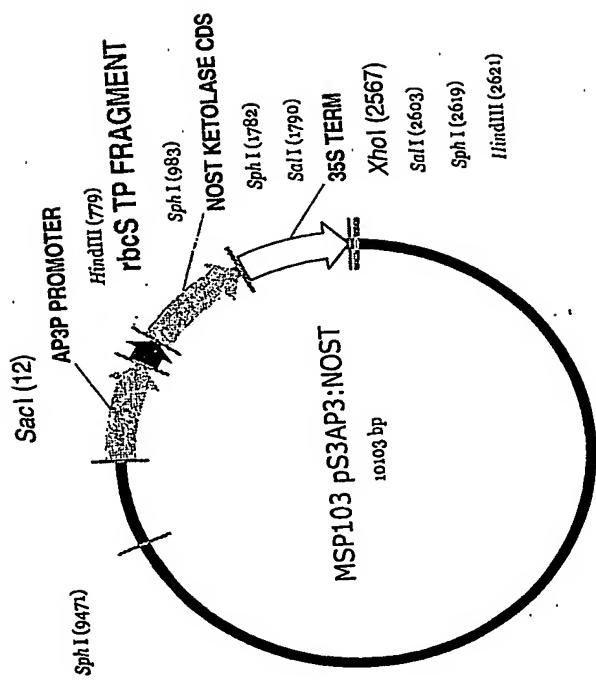


Abbildung 5

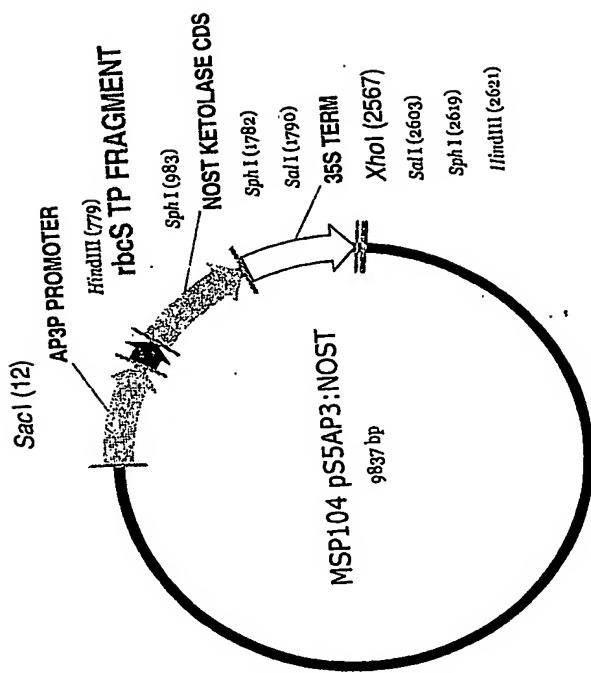
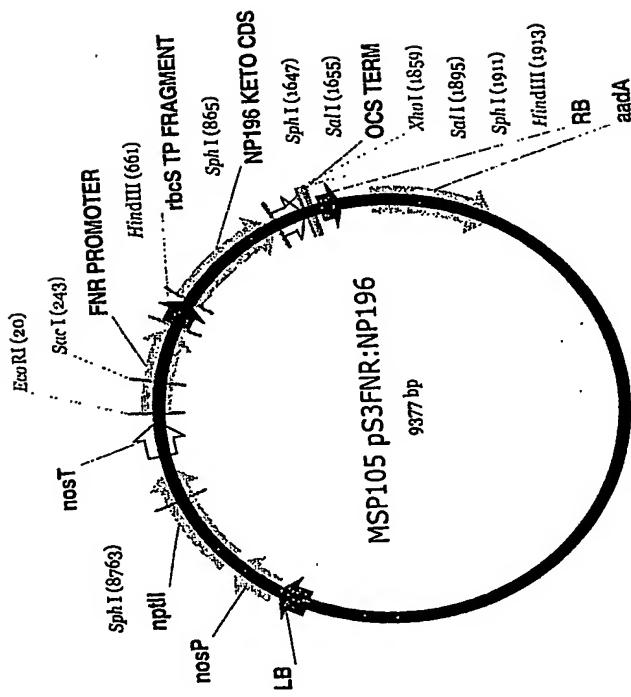
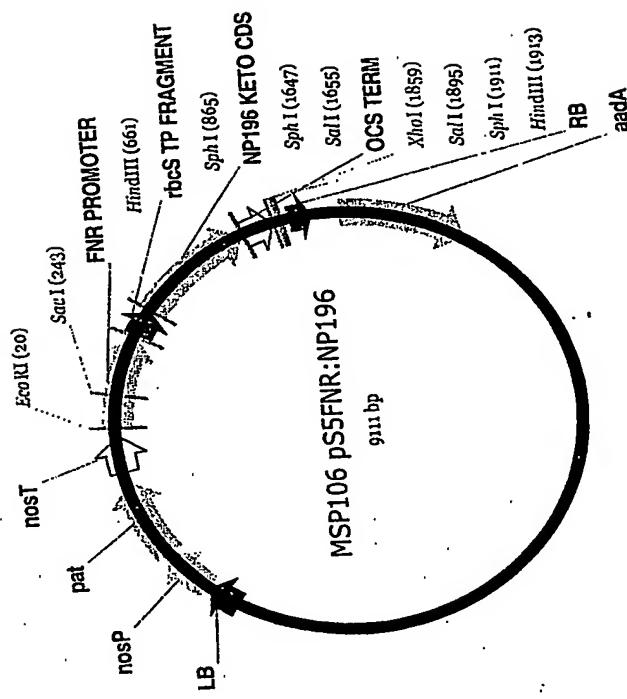
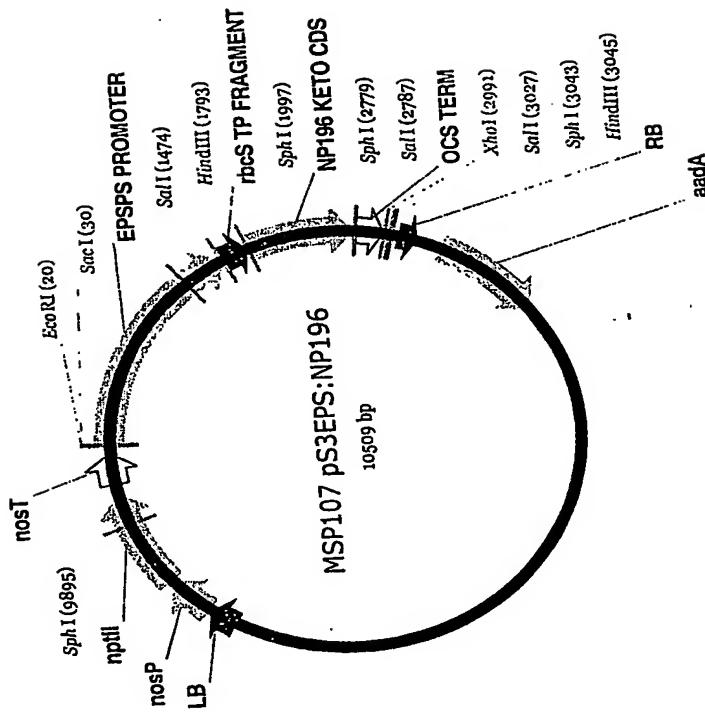
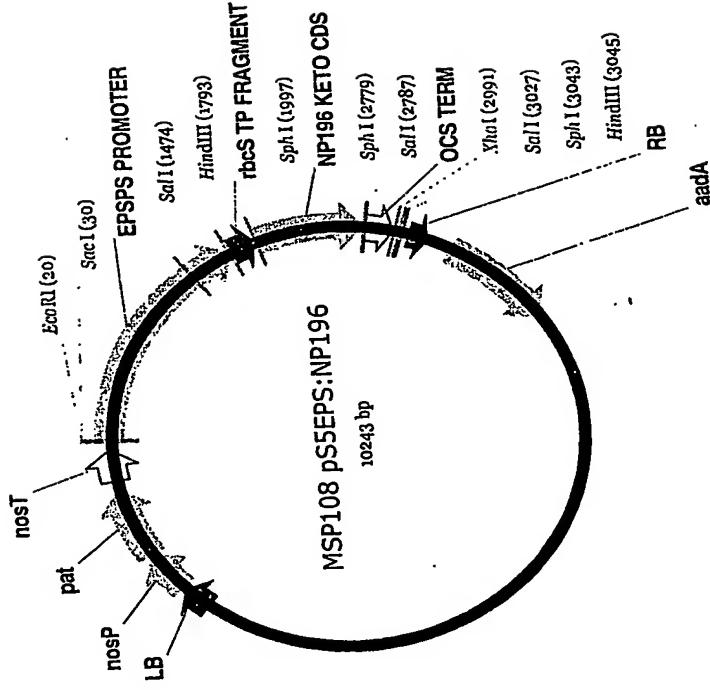


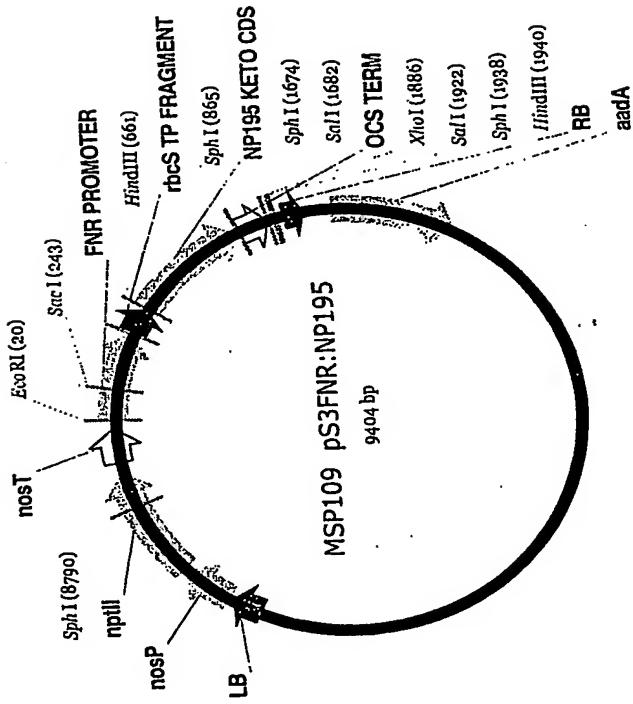
Abbildung 6











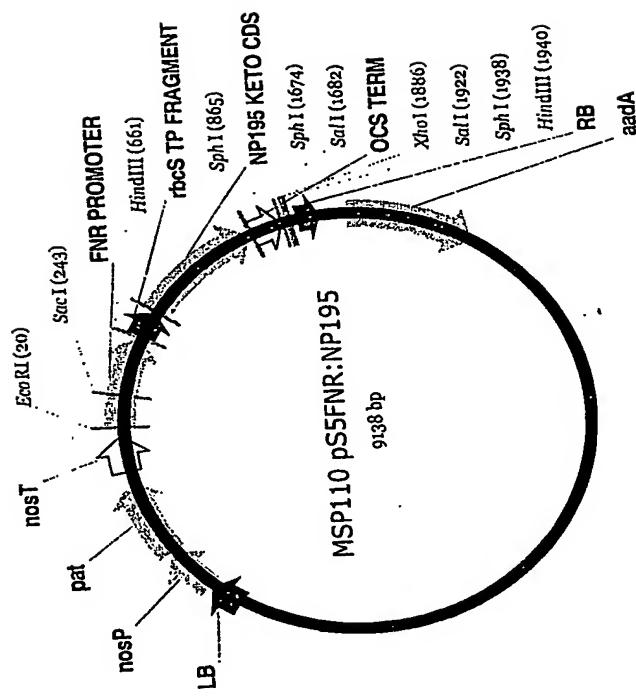


Abbildung 12

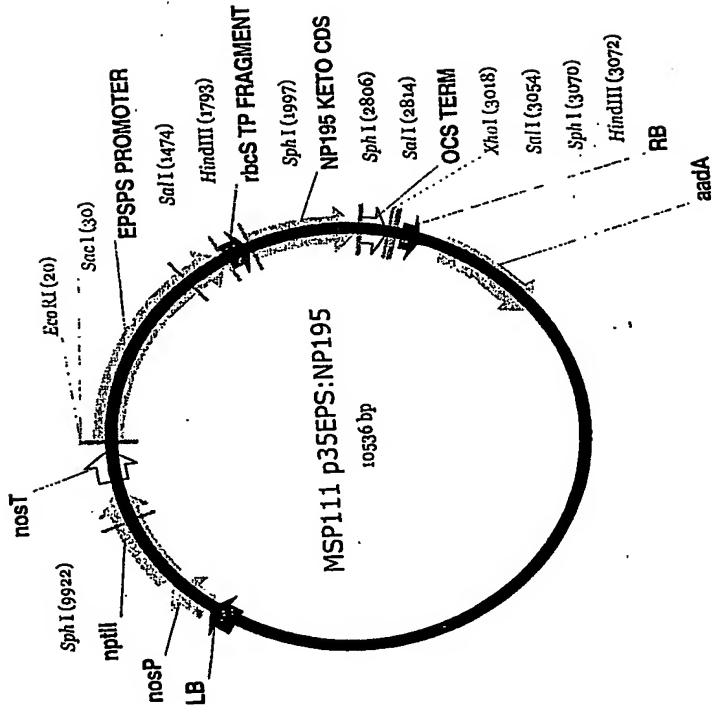
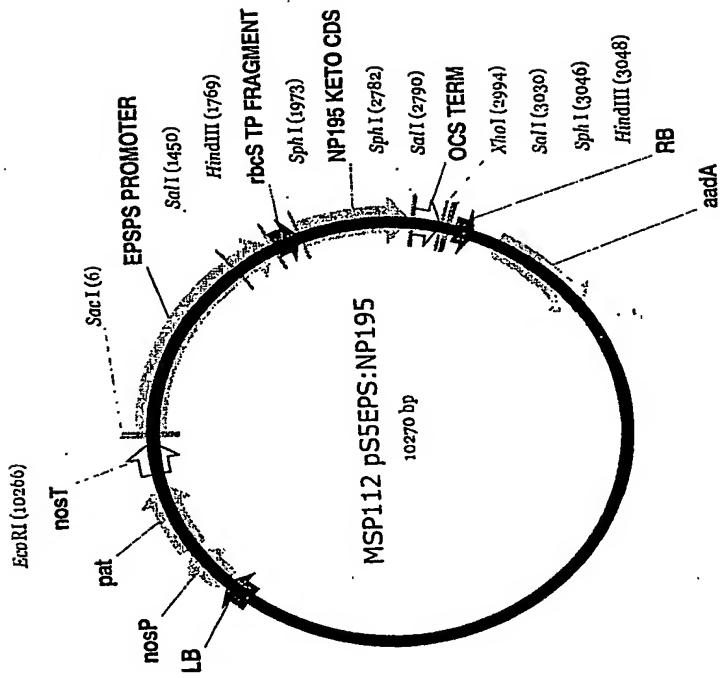
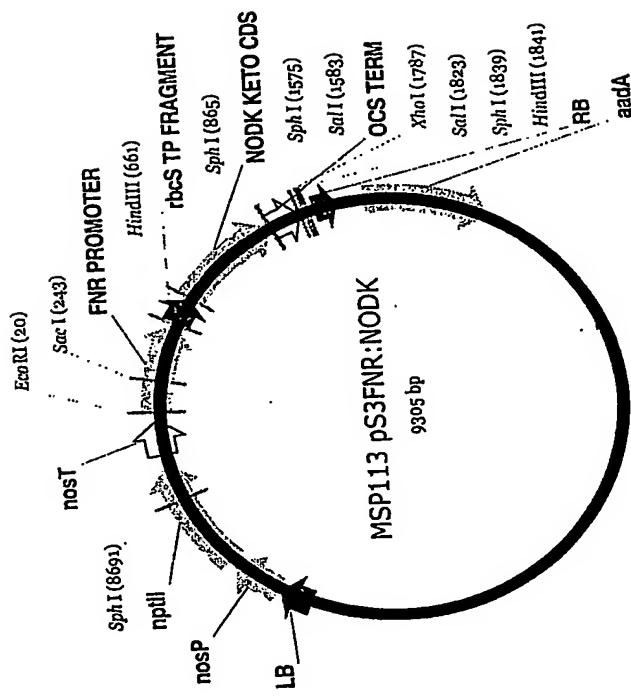
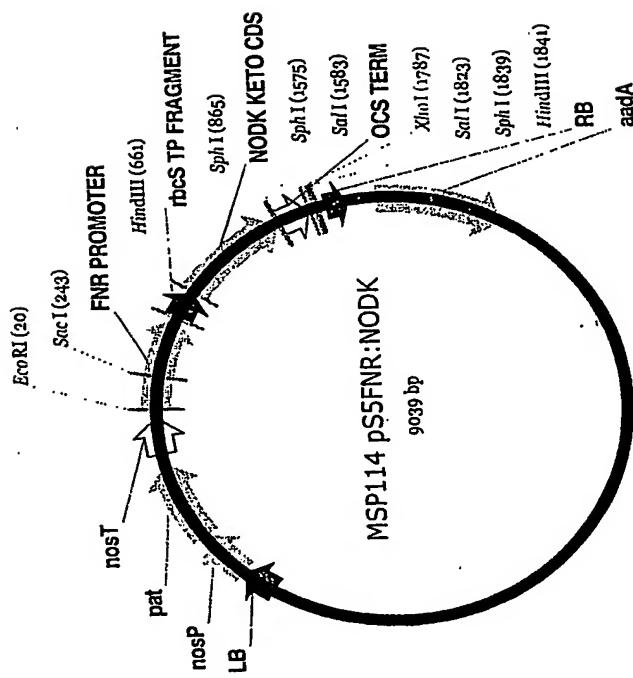
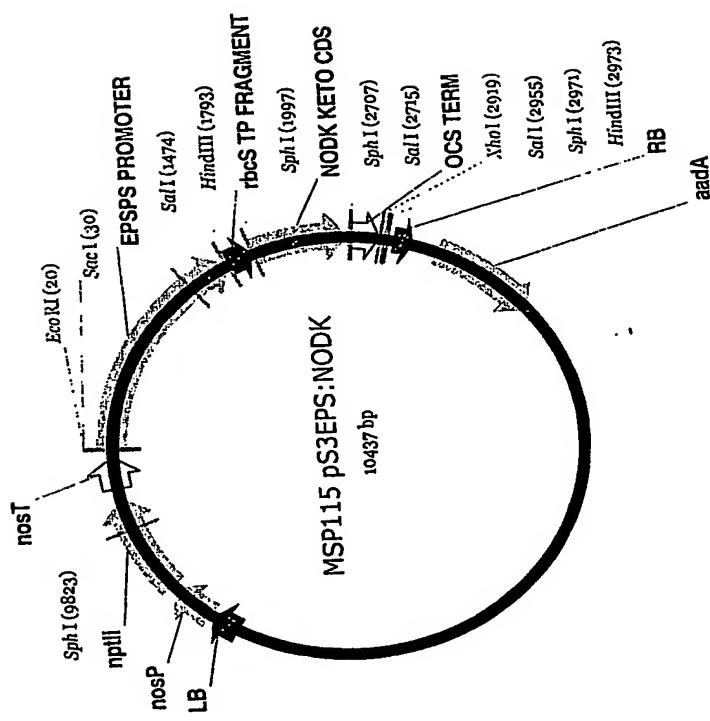


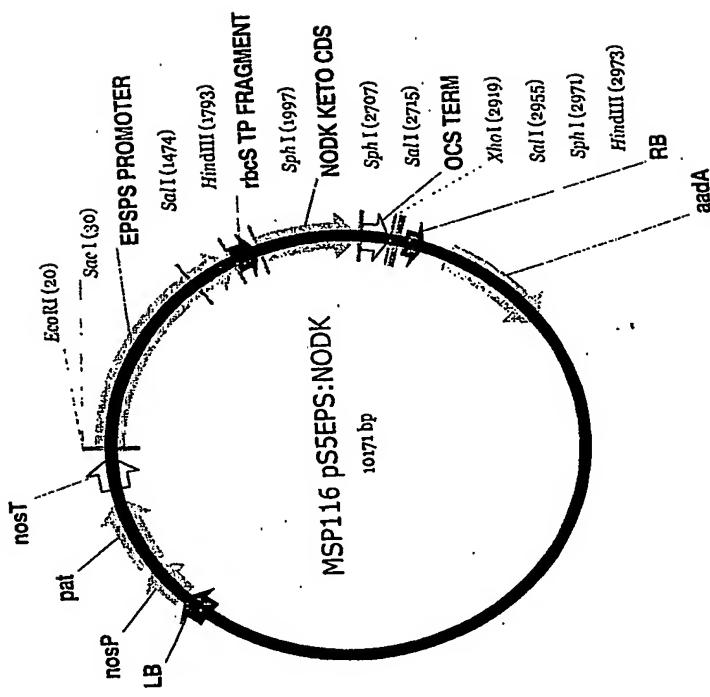
Abbildung 13











## SEQUENCE LISTING

5 &lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co. KGaA

10 <120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in genetisch verän-  
derten Organismen

15 &lt;130&gt; 20020636

20 &lt;160&gt; 74

25 &lt;170&gt; PatentIn version 3.1

30 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 777

35 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nostoc sp. Strain PCC7120

40 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

45 &lt;222&gt; (1)..(777)

&lt;223&gt;

45	<400> 1 atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu 5 10 15	48
50	ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe 20 25 30	96
55	att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu 35 40 45	144
60	ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala 50 55 60	192
65	atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 65 70 75 80	240
70	gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn 85 90 95	288

ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys 100 105 110	336
5 gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp 115 120 125	384
10 tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp 130 135 140	432
15 tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly 145 150 155 160	480
20 tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu 165 170 175	528
25 aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val 180 185 190	576
30 ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe 210 215 220	624
35 tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His 225 230 235 240	672
40 gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct tac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile 245 250 255	720
45 tct tta taa Ser Leu	768
50 <210> 2	777
55 <211> 258	
50 <212> PRT	
55 <213> Nostoc sp. Strain PCC7120	
60 <400> 2	
60 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu 1 5 10 15	
65 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe 20 25 30	
70 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu 35 40 45	
70 Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	

50

55

60

5 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

10 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

15 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

20 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

25 Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

30 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

35 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

40 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

45 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

50 Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

55 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

60 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

65 Ser Leu

70 <210> 3

70 <211> 789

70 <212> DNA

70 <213> Nostoc punctiforme

70 <220>

70 <221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

5

<400> 3  
 ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15  
  
 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30  
  
 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45  
  
 tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192  
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60  
  
 atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240  
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
  
 ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288  
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95  
  
 cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336  
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110  
  
 aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat 384  
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125  
  
 ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432  
 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140  
  
 atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta 480  
 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160  
  
 ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc 528  
 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175  
  
 tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat 576  
 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
  
 ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205  
  
 ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220  
  
 gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720  
 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
  
 gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768  
 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

aat tca gta acc aat tcg taa 789  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5  
 <210> 4  
 <211> 262  
 10 <212> PRT  
 <213> *Nostoc punctiforme*

15  
 <400> 4

20 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

25 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

30 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

35 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

40 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

45 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

50 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

55 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

60 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

65 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

70

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

5 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

10 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

15 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

<210> 5

20 <211> 762

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)...(762)

35 <223>

<400> 5  
 40 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

45 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

50 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

55 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

60 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

65 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384  
 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp

70 115 120 125

5	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe 130 135 140	432
10	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile 145 150 155 160	480
15	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr 165 170 175	528
20	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
25	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln 195 200 205	624
30	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile 210 215 220	672
35	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
40	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys 245 250	762
45	<210> 6	
50	<211> 253	
55	<212> PRT	
60	<213> Nostoc punctiforme	
65	<400> 6	
70	Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro 1 5 10 15	
	Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 20 25 30	
	Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45	
	Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60	
	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His 65 70 75 80	
	Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 85 90 95	

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

5 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

10 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

15 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

20 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

25 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

30 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

35 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

40 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

45 <210> 7

46 <211> 789

47 <212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

55 <220>

56 <221> CDS

57 <222> (1)...(789)

58 <223>

60 <400> 7  
 61 atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa  
 62 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 63 1 5 10 15 48

64 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta  
 65 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 66 20 25 30 96

70

	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144
5	tat gcc aaa att cat aag tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192
10	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
15	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288
20	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336
	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125	384
25	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432
30	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480
35	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528
40	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205	624
45	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220	672
50	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
55	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255	768
60	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260	789
	<210> 8	
65	<211> 262	
	<212> PRT	
70	<213> Künstliche Sequenz	

&lt;400&gt; 8

5 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

10 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

15 Tyr Ala Lys Ile His Lys Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

20 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

25 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

30 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

35 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

40 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

45 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

50 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

55 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

60 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

65 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

70 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5	<210> 9						
5	<211> 789						
	<212> DNA						
10	<213> Künstliche Sequenz						
	<220>						
15	<221> CDS						
	<222> (1)..(789)						
20	<223>						
25	<table border="0"> <tr> <td>&lt;400&gt; 9</td><td>48</td></tr> <tr> <td>atg aat ttt tgg gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 5 10 15</td><td></td></tr> <tr> <td>tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30</td><td>96</td></tr> </table>	<400> 9	48	atg aat ttt tgg gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 5 10 15		tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30	96
<400> 9	48						
atg aat ttt tgg gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 5 10 15							
tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30	96						
30	<table border="0"> <tr> <td>att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45</td><td>144</td></tr> </table>	att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144				
att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	144						
35	<table border="0"> <tr> <td>tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60</td><td>192</td></tr> </table>	tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192				
tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	192						
40	<table border="0"> <tr> <td>atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80</td><td>240</td></tr> </table>	atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240				
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240						
45	<table border="0"> <tr> <td>ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95</td><td>288</td></tr> </table>	ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288				
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	288						
50	<table border="0"> <tr> <td>cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110</td><td>336</td></tr> </table>	cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336				
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	336						
55	<table border="0"> <tr> <td>aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125</td><td>384</td></tr> </table>	aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	384				
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gat tta gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	384						
60	<table border="0"> <tr> <td>ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140</td><td>432</td></tr> </table>	ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432				
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	432						
65	<table border="0"> <tr> <td>atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160</td><td>480</td></tr> </table>	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480				
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160	480						
70	<table border="0"> <tr> <td>ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175</td><td>528</td></tr> </table>	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528				
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175	528						
70	<table border="0"> <tr> <td>tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190</td><td>576</td></tr> </table>	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576				
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576						

5	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205	624
10	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220	672
15	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
20	gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255	768
25	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260	789
30	<210> 10	
35	<211> 262	
40	<212> PRT	
45	<213> Künstliche Sequenz	
50	<400> 10	
55	Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15	
60	Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30	
65	Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45	
70	Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60	
75	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80	
80	Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95	
85	Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110	
90	Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	
95	Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140	
100	70	

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gin Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

5 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

10 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

15 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

20 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

25 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

30 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

35 <210> 11

40 <211> 762

45 <212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

55 <220>

60 <221> CDS

65 <222> (1) .. (762)

70 <223>

55	<400> 11 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro 1 5 10 15	48
60	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 20 25 30	96
65	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45	144
70	atc tca aag att cat aag tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60	192
	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240

65	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	80	
	65 70 75		
5	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288	
	5 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	95	
	85 90		
10	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336	
	10 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	110	
	100 105		
	aaa cat tgg tta cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384	
	115 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	120 125	
15	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432	
	130 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	135 140	
20	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480	
	145 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	150 155 160	
25	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528	
	165 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	170 175	
	160		
30	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat	576	
	180 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr	185 190	
	180		
35	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag	624	
	195 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln	200 205	
	195		
40	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc	672	
	210 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile	215 220	
	210		
45	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat	720	
	225 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	230 235 240	
	225		
	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag	762	
50	45 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys	245 250	
	245		
	<210> 12		
	<211> 253		
	<212> PRT		
55	<213> Künstliche Sequenz		
	<400> 12		
60	60 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	15	
	1 5 10		
65	65 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val	30	
	20 25		
70	70 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp	45	
	35 40 45		

Ile Ser Lys Ile His Lys Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

5 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

10 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

15 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

20 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

25 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

30 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160

35 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

40 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

45 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

50 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

55 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

60 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

65 <210> 13  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 70 <213> Künstliche Sequenz

65 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(762)

&lt;223&gt;

5	<400> 13 atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro 1 5 10 15	48
10	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 20 25 30	96
15	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45	144
20	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60	192
25	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His 65 70 75 80	240
30	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 85 90 95	288
35	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys 100 105 110	336
40	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc gat tta gac ccg gat Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp 115 120 125	384
45	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe 130 135 140	432
50	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile 145 150 155 160	480
55	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr 165 170 175	528
60	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr 180 185 190	576
65	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln 195 200 205	624
70	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile 210 215 220	672
75	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	720
80	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys 245 250	762

<210> 14  
 <211> 253  
 5 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 10 <400> 14  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 15 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 20 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 25 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 30 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 35 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 40 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Asp Leu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 45 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 50 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175  
 55 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 60 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 65 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 70 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

5

&lt;210&gt; 15

10 &lt;211&gt; 1608

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

15

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3) .. (971)

&lt;223&gt;

25

&lt;400&gt; 15

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47  
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile  
 30 1 5 10 15

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95  
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu  
 20 25 30

35

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc gtt gaa cta gcc 143  
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala  
 35 40 45

40

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191  
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
 50 55 60

45

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gac ctg gga 239  
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly  
 65 70 75

50

acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287  
 Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala  
 80 85 90 95

55

ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335  
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys  
 100 105 110

60

cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383  
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly  
 115 120 125

65

gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431  
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His  
 130 135 140

70

atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479  
 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu  
 145 150 155

ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat 527  
 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr  
 160 165 170 175

5	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His 180 185 190	575
10	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu 195 200 205	623
15	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly 210 215 220	671
20	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu 225 230 235	719
25	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu 240 245 250 255	767
30	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met 260 265 270	815
35	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly 275 280 285	863
40	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile 290 295 300	911
45	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp 305 310 315	959
50	tcc aag cgg tag ggtgcggAAC caggcacgct ggTTTcacac ctcatgcctg Ser Lys Arg 320	1011
55	tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggctgt tggccaatgg catcgccat gtctggcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc caggctggcg ttgaatcagt gagggttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc catattctat ttgtgggagc tgagatgtg gcatgctgg gatgtgcgt gatcatggta gtgcagcaaa ctatattcac ctaggcgtgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg catgatgtac tcgtcatggt gtgttggta gaggatggat gtggatggat gtgtattctc agacgttagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 60 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1608	1071 1131 1191 1251 1311 1371 1431 1491 1551
65	<210> 16	
70	<211> 322	
	<212> PRT	
	<213> Haematococcus pluvialis	

<400> 16  
 5 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15  
 10 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30  
 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45  
 15 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60  
 20 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 25 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95  
 30 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110  
 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
 115 120 125  
 35 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
 130 135 140  
 40 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
 145 150 155 160  
 45 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
 165 170 175  
 50 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
 180 185 190  
 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
 195 200 205  
 55 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
 210 215 220  
 60 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
 225 230 235 240  
 65 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255  
 70 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 5 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300  
 10 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser.  
 305 310 315 320  
 15 Lys Arg  
 20 <210> 17  
 <211> 1650  
 <212> DNA  
 25 <213> Lycopersicon esculentum  
 30 <220>  
 35 <221> CDS  
 <222> (112)..(1614)  
 40 <223>  
 45 <400> 17  
 ggcacgagga aacttttctc tcttcactag ctgtttacat gcttgaaatt tcaagatttt 60  
 aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaaa g atg gat 117  
 Met Asp 1  
 50 act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat 165  
 Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His  
 5 10 15  
 55 ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat 213  
 Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn  
 20 25 30  
 60 ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt 261  
 Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val Cys Val  
 35 40 45 50  
 65 aag ggt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc aaa aag 309  
 Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys  
 55 60 65  
 70 gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa ggg gtt 357  
 Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Val  
 75 80  
 75 gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggc cct gca gga ctt gct gtt 405  
 Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val  
 85 90 95  
 70 gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att gat ccg 453

	Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Léu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro	
100	105	110
5	aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg gat gaa Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu 115 120 125 130	501
10	ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg tct ggt Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp Ser Gly 135 140 145	549
15	gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat aga cct Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His Arg Pro 150 155 160	597
20	tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg cag aaa Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met Gln Lys 165 170 175	645
25	tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata aag gtg Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val 180 185 190	693
30	att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt att act Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly Ile Thr 195 200 205 210	741
35	att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga tct ctt Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Ser Leu 215 220 225	789
40	gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct tat ggc Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr Gly 230 235 240	837
45	att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag atg gtt Ile Leu Ala Glu Val Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys Met Val 245 250 255	885
50	ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat ctc aag Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp Leu Lys 260 265 270	933
55	gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca ttt tca Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Ser 275 280 285 290	981
60	tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt cct ggc Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro Gly 295 300 305	1029
65	ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta aac cat Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Asn His 310 315 320	1077
70	ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt cta ata Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Leu Ile 325 330 335	1125
75	cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt gga atc Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile 340 345 350	1173
80	ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg gtg gca Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala 355 360 365 370	1221
85	agg aca cta gct ggc gct cct gtt gcc aat gcc ata att caa tac Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile Gln Tyr 375 380 385	1269

	ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt	1317
	Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val	
	390 395 400	
5	tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc	1365
	Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe	
	405 410 415	
10	tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga	1413
	Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg	
	420 425 430	
15	agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc	1461
	Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly	
	435 440 445 450	
20	ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg	1509
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu	
	455 460 465	
25	tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca	1557
	Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr	
	470 475 480	
30	aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat	1605
	Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp	
	485 490 495	
35	aaa gaa tga atccgagtaa ttccggatct tgtccaatct cgtgcc	1650
	Lys Glu	
	500	
40	<211> 500	
	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	
45	<400> 18	
	<211> 500	
	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	
50	Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro	
	1 5 10 15	
	His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His	
	20 25 30	
55	His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val	
	35 40 45	
	Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr	
60	50 55 60	
	Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys	
	65 70 75 80	
65	Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu	
	85 90 95	

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
 100 105 110

5 Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
 115 120 125

10 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
 130 135 140

15 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
 145 150 155 160

20 Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
 165 170 175

25 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
 180 185 190

30 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
 195 200 205

35 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
 210 215 220

40 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
 225 230 235 240

45 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
 245 250 255

50 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
 260 265 270

55 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
 275 280 285

60 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
 290 295 300

65 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
 305 310 315 320

70 Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335

75 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350

80 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

85 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

5 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400  
 10 Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415  
 15 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430  
 20 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445  
 25 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460  
 30 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480  
 35 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495  
 40 Gln Asp Lys Glu  
 500  
 45 <210> 19  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 50 <213> Künstliche Sequenz  
 55 <220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> (1)...(33)  
 <223>  
 60 <400> 19  
 gcatgctcta gacctataa agatattttg tga 33  
 <210> 20  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 65 <213> Künstliche Sequenz  
 70 <220>

<221> primer\_bind  
<222> (1)..(33)  
5 <223>  
  
10 <400> 20 gcatgcacatc agaaatggtt cagtgtcaac cat 33  
  
15 <210> 21  
<211> 805  
<212> DNA  
<213> Nostoc sp. Strain PCC7120  
20  
  
<220>  
25 <221> variation  
<222> (1)..(805)  
<223>  
30  
  
35 <400> 21 gcatgcacatc agaaatggtt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactggtgt 60  
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggtatattt attgcctgct 120  
ttatcttatt tttatggca attagttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180  
40 ttcataagag cttatttagt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240  
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300  
attttataagg taagctcaact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360  
45 aaaaacattt gttacaccac ggacatcctg gtactgatt agaccctgat tattacaatg 420  
gtcatccccca aaacttcttt ctttggtatac tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480  
50 cgc当地 cggatttagt atgattttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540  
aaaataattt aattatattt tggatgatac cttcttattt aagttcagta caacttattt 600  
55 attttggtagt attttgcct cataaaaagc tagaagggtgg ttataactaac ccccatgtg 660  
cgc当地 cccattaccc tttttgggt cttttgtac ttgttatcac ttccggctacc 720  
acaaggaaaca tcacgaatac cctcaacttc cttgggtggaa attacctgaa gctcacaaaa 780  
60 tatcttata aggtcttagag catgc 805  
  
65 <210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
70

<220>  
5 <221> primer\_bind  
<222> (1)...(24)  
<223>  
10  
  
<400> 22 24  
15 aggtaccgca cggctctgccca atcc  
  
<210> 23  
<211> 26  
20 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
25 <221> primer\_bind  
30 <222> (1)...(26)  
<223>  
  
<400> 23 26  
35 aagcttgacc tgattatcag cacggc  
  
<210> 24  
<211> 4624  
40 <212> DNA  
<213> Erwinia uredovora  
  
<220>  
50 <221> CDS  
55 <222> (128)...(1267)  
<223>  
  
<220>  
60 <221> CDS  
<222> (1288)...(2766)  
65 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (2802) .. (3689)  
 <223>  
 10 <220>  
 <221> iDNA  
 15 <222> (3631) .. (4158)  
 <223>  
 20 <400> 24  
 gtcgactttc agcagcgcat ggcgaaaatc cagacagccc ttcgtttggc agggggcacc 60  
 atggccgctg ccgatatcat tgagcaggtt atgtgcaccc gtcagcctgt cttaagtggg 120  
 25 agcggct atg caa ccg cat tat gat ctg att ctc gtg ggg gct gga ctc 169  
     Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu  
     1               5               10  
 30 gcg aat ggc ctt atc gcc ctg cgt ctt cag cag cag caa cct gat atg 217  
   Ala Asn Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met  
   15               20               25               30  
 35 cgt att ttg ctt atc gac gcc gca ccc cag gcg ggc ggg aat cat acg 265  
   Arg Ile Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr  
   35               40               45  
 40 tgg tca ttt cac cac gat gat ttg act gag agc caa cat cgt tgg ata 313  
   Trp Ser Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile  
   50               55               60  
 45 gct ccg ctg gtg gtt cat cac tgg ccc gac tat cag gta cgc ttt ccc 361  
   Ala Pro Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro  
   65               70               75  
 50 aca cgc cgt cgt aag ctg aac agc ggc tac ttt tgt att act tct cag 409  
   Thr Arg Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln  
   80               85               90  
 55 cgt ttc gct gag gtt tta cag cga cag ttt ggc ccg cac ttg tgg atg 457  
   Arg Phe Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met  
   95               100               105               110  
 60 gat acc gcg gtc gca gag gtt aat gcg gaa tct gtt cgg ttg aaa aag 505  
   Asp Thr Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys  
   115               120               125  
 65 ggt cag gtt atc ggt gcc cgc gcg gtc att gac ggg cgg ggt tat gcg 553  
   Gly Gln Val Ile Gly Ala Arg Ala Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala  
   130               135               140  
 70 gca aat tca gca ctg agc gtg ggc ttc cag gcg ttt att ggc cag gaa 601  
   Ala Asn Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu  
   145               150               155  
 75 tgg cga ttg agc cac ccg cat ggt tta tcg tct ccc att atc atg gat 649  
   Trp Arg Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp  
   160               165               170  
 80 gcc acg gtc gat cag caa aat ggt tat cgc ttc gtg tac agc ctg ccg 697

	Ala Thr Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro		
175	180	185	190
5	ctc tcg ccg acc aga ttg tta att gaa gac acg cac tat att gat aat Leu Ser Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn	195	200
	200	205	745
10	gcg aca tta gat cct gaa tgc gcg ccg caa aat att tgc gac tat gcc Ala Thr Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala	210	215
	220	220	793
15	gcg caa cag ggt tgg cag ctt cag aca ctg ctg cga gaa gaa cag ggc Ala Gln Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly	225	230
	235	235	841
20	gcc tta ccc att act ctg tcg ggc aat gcc gac gca ttc tgg cag cag Ala Leu Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln	240	245
	250	250	889
25	cgc ccc ctg gcc tgt agt gga tta cgt gcc ggt ctg ttc cat cct acc Arg Pro Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr	255	260
	265	270	937
30	acc ggc tat tca ctg ccg ctg gcg gtt gcc gtg gcc gac cgc ctg agt Thr Gly Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser	275	280
	285	285	985
35	gca ctt gat gtc ttt acg tcg gcc tca att cac cat gcc att acg cat Ala Leu Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His	290	295
	300	300	1033
40	ttt gcc cgc gag cgc tgg cag cag ggc ttt ttc cgc atg ctg aat Phe Ala Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn	305	310
	315	315	1081
45	cgc atg ctg ttt tta gcc gga ccc gcc gat tca cgc tgg cgg gtt atg Arg Met Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met	320	325
	330	330	1129
50	cag cgt ttt tat ggt tta cct gaa gat tta att gcc cgt ttt tat gcg Gln Arg Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala	335	340
	345	350	1177
55	355	360	1225
60	365	365	1267
65	cct gtt ccg gta tta gca gca ttg caa gcc att atg acg act Pro Val Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr	370	375
	380	380	1320
70	catcgtaaaa gagcgactac atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe	385	390
	390	390	1368
75	ggt ggc ctg gca ctg gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc Gly Gly Leu Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val	395	400
	405	405	1416
80	tta ctg ctt gaa caa cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac Leu Leu Leu Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr	410	415
	420	420	1464
85	425	430	1512
90	435	440	445
	450	455	

gag tat gtc gaa ctg ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg	1560
Glu Tyr Val Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp	
460 465 470	
5 gag tca ggg aag gtc ttt aat tac gat aac gat caa acc ccg ctc gaa	1608
Glu Ser Gly Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu	
475 480 485	
10 gcg cag att cag cag ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag	1656
Ala Gln Ile Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln	
490 495 500	
15 ttt ctg gac tat tca cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc	1704
Phe Leu Asp Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu	
505 510 515	
20 ggt act gtc cct ttt tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct	1752
Gly Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro	
520 525 530 535	
25 caa ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc	1800
Gln Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala	
540 545 550	
30 agt tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg	1848
Ser Tyr Ile Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser	
555 560 565	
35 ctg ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg	1896
Leu Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu	
570 575 580	
40 ata cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc	1944
Ile His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly	
585 590 595	
45 acc ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt	1992
Thr Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly	
600 605 610 615	
50 ggc gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga	2040
Gly Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly	
620 625 630	
55 aac aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg	2088
Asn Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr	
635 640 645	
60 caa gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg	2136
Gln Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu	
650 655 660	
55 tta agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act	2184
Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr	
665 670 675	
60 aag cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac	2232
Lys Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His	
680 685 690 695	
65 cat cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac	2280
His His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr	
700 705 710	
70 cgc gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac	2328
Arg Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp	
715 720 725	
70 ttc tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg	2376

	Phe Ser Leu Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala	
	730 735 740	
5	cct gaa ggt tgc ggc agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta Pro Glu Gly Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu 745 750 755	2424
10	ggc acc gcg aac ctc gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac Gly Thr Ala Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp 760 765 770 775	2472
15	cgt att ttt gcg tac ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt Arg Ile Phe Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser 780 785 790	2520
20	cag ctg gtc acg cac cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag Gln Leu Val Thr His Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln 795 800 805	2568
25	ctt aat gcc tat cat ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc Leu Asn Ala Tyr His Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr 810 815 820	2616
30	cag agc gcc tgg ttt cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat Gln Ser Ala Trp Phe Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn 825 830 835	2664
35	ctc tac ctg gtc ggc gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc Leu Tyr Leu Val Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly 840 845 850 855	2712
40	gtc atc ggc tcg gca aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg Val Ile Gly Ser Ala Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu 860 865 870	2760
45	att tga ataatccgtc gttactcaat catgcggtcg aaacg atg gca gtt ggc Ile Met Ala Val Gly 875	2813
50	tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc cgg Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr Arg 880 885 890	2861
55	cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat gtt Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp Val 895 900 905	2909
60	att gac gat cag acg ctg ggc ttt cag gcc cgg cag cct gcc tta caa Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu Gln 910 915 920	2957
65	acg ccc gaa caa cgt ctg atg caa ctt gag atg aaa acg cgc cag gcc Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln Ala 925 930 935 940	3005
70	tat gca gga tcg cag atg cac gaa ccg gcg ttt gcg gct ttt cag gaa Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln Glu 945 950 955	3053
	gtg gct atg gct cat gat atc gcc ccg gct tac gcg ttt gat cat ctg Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His Leu 960 965 970	3101
	gaa ggc ttc gcc atg gat gta cgc gaa gcg caa tac agc caa ctg gat Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu Asp 975 980 985	3149
	gat acg ctg cgc tat tgc tat cac gtt gca ggc gtt gtc ggc ttg atg Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu Met 990 995 1000	3197

	atg	gcg	caa	atc	atg	ggc	gtg	cg	gat	aac	gcc	acg	ctg	gac	cgc	3242
	Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
5	1005					1010					1015					
	gcc	tgt	gac	ctt	ggg	ctg	gca	ttt	cag	ttg	acc	aat	att	gct	cgc	3287
	Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg	
	1020					1025					1030					
10	gat	att	gtg	gac	gat	gcg	cat	gcg	ggc	cgc	tgt	tat	ctg	ccg	gca	3332
	Asp	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala	
	1035					1040					1045					
15	agc	tgg	ctg	gag	cat	gaa	gg	ctg	aac	aaa	gag	aat	tat	gcg	gca	3377
	Ser	Trp	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ala	
	1050					1055					1060					
20	cct	gaa	aac	cgt	cag	gcg	ctg	agc	cgt	atc	gcc	cgt	cgt	ttg	gtg	3422
	Pro	Glu	Asn	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	
	1065					1070					1075					
25	cag	gaa	gca	gaa	cct	tac	tat	ttg	tct	gcc	aca	gcc	ggc	ctg	gca	3467
	Gln	Glu	Ala	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	
	1080					1085					1090					
30	ggg	ttg	ccc	ctg	cgt	tcc	gcc	tgg	gca	atc	gct	acg	gcg	aag	cag	3512
	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Trp	Ala	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	Gln	
	1095					1100					1105					
35	gtt	tac	cg	aaa	ata	ggt	gtc	aaa	gtt	gaa	cag	gcc	ggt	cag	caa	3557
	Val	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gly	Val	Lys	Val	Glu	Gln	Ala	Gly	Gln	Gln	
	1110					1115					1120					
40	gcc	tgg	gat	cag	cg	cag	tca	acg	acc	acg	ccc	gaa	aaa	tta	acg	3602
	Ala	Trp	Asp	Gln	Arg	Gln	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr	
	1125					1130					1135					
45	ctg	ctg	ctg	gcc	gcc	tct	ggt	cag	gcc	ctt	act	tcc	cg	atg	cg	3647
	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Gly	Gln	Ala	Leu	Thr	Ser	Arg	Met	Arg	
	1140					1145					1150					
50	gct	cat	cct	ccc	cgc	cct	g	cg	cat	ctc	ttg	cag	cg	cc	ctc	3689
	Ala	His	Pro	Pro	Arg	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Gln	Arg	Pro	Leu		
	1155					1160					1165					
55	tagcgccatg	tctttcccg	agcg	tgcgc	cct	gaagtttga	cagg	ggc	ggc	ggc	gc	atag	agg	aa	gg	3749
	agccaaaaga	aacacaac	ct	tcttt	cccc	tgacggcgt	atgc	cata	acgg	tgc	ccat	at	tg	gc	ccat	3809
60	acaaccgtt	gaggtagccc	ttgcgtggaa	tata	cg	ggc	ccaa	cac	tttacg	cg	gtt	cat	ga	tgt	gaa	3869
	ccccgtcgt	caccataaaa	tagagtaatc	cata	cgccgt	cata	cct	gtc	cc	aa	at	cc	act	cc	act	3929
	ggagcggcca	cattcctgta	ctgccc	agat	aaatc	cg	atc	cgata	at	gc	agc	aaaa	aa	gg	aa	3989
65	ccacggcata	aagatcgtt	acttcaaa	ac	tttacg	cac	ctt	acg	cg	tt	cat	ga	tgt	gaa	agat	4049
	gccccatccca	accc	cagccg	tg	cat	gtat	at	ttgtgt	gc	c	at	tc	act	cc	act	4109
70	tgc	caatc	c	gt	aa	ac	ac	gt	cc	aa	at	tt	ct	cc	gg	4169
	tagagacgt	tgg	cagc	agg	ctt	aa	gtt	aa	ttt	aa	ac	ttt	tt	cc	gg	4229
	gcccc	aa	aaaa	agg	cg	cc	aa	agg	cg	cc	cc	at	c	gg	ttt	4289
	accacacggt	agt	ttgg	c	tt	ac	ct	gc	ac	at	gg	tcc	at	ttt	cg	4349
	atc	gg	aa	gt	tt	cc	ac	tc	gt	cc	tt	cg	at	ttt	cg	4409
75	cgc	ca	ct	qc	q	ca	q	gt	ta	aa	gg	cc	tc	ac	gg	4469

ctgaaaagccg	ggcacgtcaa	acggcttcag	tacggcaccc	acggtatgga	acttaccg	4529	
5	aggcgccagg	gccgcaaagt	agggttgcca	gtcgagatcg	acggcgaccg	tgctgataat	4589
	caggtcaaac	tggcccgcca	ggcttttaa	agctt			4624
10	<210>	25					
	<211>	380					
	<212>	PRT					
15	<213>	Erwinia uredovora					
20	<400>	25					
	Met Gln Pro His Tyr Asp Leu Ile Leu Val Gly Ala Gly Leu Ala Asn						
	1	5	10			15	
25	Gly Leu Ile Ala Leu Arg Leu Gln Gln Gln Pro Asp Met Arg Ile						
	20	25	30				
30	Leu Leu Ile Asp Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gly Asn His Thr Trp Ser						
	35	40	45				
35	Phe His His Asp Asp Leu Thr Glu Ser Gln His Arg Trp Ile Ala Pro						
	50	55	60				
40	Leu Val Val His His Trp Pro Asp Tyr Gln Val Arg Phe Pro Thr Arg						
	65	70	75	80			
45	Arg Arg Lys Leu Asn Ser Gly Tyr Phe Cys Ile Thr Ser Gln Arg Phe						
	85	90	95				
50	Ala Glu Val Leu Gln Arg Gln Phe Gly Pro His Leu Trp Met Asp Thr						
	100	105	110				
55	Ala Val Ala Glu Val Asn Ala Glu Ser Val Arg Leu Lys Lys Gly Gln						
	115	120	125				
60	Val Ile Gly Ala Arg Ala Val Ile Asp Gly Arg Gly Tyr Ala Ala Asn						
	130	135	140				
65	Ser Ala Leu Ser Val Gly Phe Gln Ala Phe Ile Gly Gln Glu Trp Arg						
	145	150	155	160			
70	Leu Ser His Pro His Gly Leu Ser Ser Pro Ile Ile Met Asp Ala Thr						
	165	170	175				
75	Val Asp Gln Gln Asn Gly Tyr Arg Phe Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser						
	180	185	190				
80	Pro Thr Arg Leu Leu Ile Glu Asp Thr His Tyr Ile Asp Asn Ala Thr						
	195	200	205				

Leu Asp Pro Glu Cys Ala Arg Gln Asn Ile Cys Asp Tyr Ala Ala Gln  
 210 215 220  
 5  
 Gln Gly Trp Gln Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Glu Gln Gly Ala Leu  
 225 230 235 240  
 10 Pro Ile Thr Leu Ser Gly Asn Ala Asp Ala Phe Trp Gln Gln Arg Pro  
 245 250 255  
 15 Leu Ala Cys Ser Gly Leu Arg Ala Gly Leu Phe His Pro Thr Thr Gly  
 260 265 270  
 20 Tyr Ser Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Leu Ser Ala Leu  
 275 280 285  
 Asp Val Phe Thr Ser Ala Ser Ile His His Ala Ile Thr His Phe Ala  
 290 295 300  
 5 Arg Glu Arg Trp Gln Gln Gly Phe Phe Arg Met Leu Asn Arg Met  
 305 310 315 320  
 30 Leu Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ser Arg Trp Arg Val Met Gln Arg  
 325 330 335  
 35 Phe Tyr Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Ala Arg Phe Tyr Ala Gly Lys  
 340 345 350  
 40 Leu Thr Leu Thr Asp Arg Leu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Pro Pro Val  
 355 360 365  
 45 Pro Val Leu Ala Ala Leu Gln Ala Ile Met Thr Thr  
 370 375 380  
 50 <210> 26  
 <211> 492  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora  
 55 <400> 26  
 60 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 65 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30  
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45  
 70

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60

5 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
 65 70 75 80

10 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
 85 90 95

15 Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
 100 105 110

20 Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser  
 115 120 125

Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe  
 130 135 140

25 Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu  
 145 150 155 160

30 Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp  
 165 170 175

35 Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly  
 180 185 190

40 Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu  
 195 200 205

Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val  
 210 215 220

45 Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu  
 225 230 235 240

50 Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala  
 245 250 255

55 Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser  
 260 265 270

Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro  
 275 280 285

60 Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn  
 290 295 300

65 Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu  
 305 310 315 320

70 Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp



Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala  
 65 70 75 80

5 Ala Phe Gln Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala  
 85 90 95

10 Phe Asp His Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr  
 100 105 110

15 Ser Gln Leu Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val  
 115 120 125

20 Val Gly Leu Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr  
 130 135 140

25 Leu Asp Arg Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile  
 145 150 155 160

30 Ala Arg Asp Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro  
 165 170 175

35 Ala Ser Trp Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala  
 180 185 190

40 Pro Glu Asn Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln  
 195 200 205

45 Glu Ala Glu Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 210 215 220

50 Pro Leu Arg Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg  
 225 230 235 240

55 Lys Ile Gly Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln  
 245 250 255

60 Arg Gln Ser Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala  
 260 265 270

65 Ser Gly Gln Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro  
 275 280 285

Ala His Leu Trp Gln Arg Pro Leu  
 290 295

<210> 28  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

```

<220>
5  <221> primer_bind
<222> (1)..(32)
<223>
10

<400> 28
tttttctcga gcgataaacg ctcacttggt ta          32
15

<210> 29
<211> 32
20  <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25

<220>
<221> primer_bind
30  <222> (1)..(32)
<223>

35

<400> 29
tttttgcgaa cacgttatgc tcacaacccc gg          32
40  <210> 30
<211> 679
45  <212> DNA
<213> Escherichia coli

50

<220>
<221> CDS
55  <222> (87)..(635)
<223>

60

<400> 30
ctcgagcgat aaacgctcac ttggtaatc atttcactct tcaattatct ataatgatga      60
65  gtgatcagaa ttacatgtga gaaatt atg caa acg gaa cac gtc att tta ttg      113
                Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu
                1           5

70  aat gca cag gga gtt ccc acg ggt acg ctg gaa aag tat gcc gca cac      161
                Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His
                10          15           20           25

```

acg gca gac acc cgc tta cat ctc gcg ttc tcc agt tgg ctg ttt aat	209
Thr Ala Asp Thr Arg Leu His Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn	
30 35 40	
5	
gcc aaa gga caa tta tta gtt acc cgc cgc gca ctg agc aaa aaa gca	257
Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala	
45 50 55	
10 tgg cct ggc gtg tgg act aac tcg gtt tgt ggg cac cca caa ctg gga	305
Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly	
60 65 70	
15 gaa agc aac gaa gac gca gtg atc cgc cgt tgc cgt tat gag ctt ggc	353
Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly	
75 80 85	
20 gtg gaa att acg cct cct gaa tct atc tat cct gac ttt cgc tac cgc	401
Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg	
90 95 100 105	
25 gcc acc gat ccg agt ggc att gtg gaa aat gaa gtg tgt ccg gta ttt	449
Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe	
110 115 120	
30 gcc gca cgc acc act agt gcg tta cag atc aat gat gat gaa gtg atg	497
Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met	
125 130 135	
35 gat tat caa tgg tgt gat tta gca gat gta tta cac ggt att gat gcc	545
Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala	
140 145 150	
40 acg ccg tgg gcg ttc agt ccg tgg atg gtg atg cag gcg aca aat cgc	593
Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg	
155 160 165	
45 gaa gcc aga aaa cga tta tct gca ttt acc cag ctt aaa taa	635
Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser Ala Phe Thr Gln Leu Lys	
170 175 180	
50 aaaaaaccccg acatttgccg gggttgtgag cataacgtgt cgac	679
<210> 31	
<211> 182	
55 <212> PRT	
<213> Escherichia coli	
60 <400> 31	
Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr	
1 5 10 15	
65 Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His	
20 25 30	
Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val	
35 40 45	
70 Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn	

50

55

60

5 Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val  
 65 70 75 80

10 Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu  
 10 85 90 95

15 Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile  
 100 105 110

20 Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala  
 115 120 125

25 Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu  
 130 135 140

30 Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro  
 145 150 155 160

35 Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser  
 165 170 175

40 Ala Phe Thr Gln Leu Lys  
 180

45 <210> 32

50 <211> 31

55 <212> DNA

60 <213> Künstliche Sequenz

65 <220>

70 <221> primer\_bind

75 <222> (1)...(31)

80 <223>

85 <400> 32  
 tttttccatg gtgaaggagg aaatagcgaa a 31

90 <210> 33

95 <211> 32

100 <212> DNA

105 <213> Künstliche Sequenz

110 70

<220>  
 <221> primer\_bind  
 5 <222> (1)..(32)  
 <223>  
 10 <400> 33  
 ttttaagct ttcactttt tcttgtaacc aa 32  
 15 <210> 34  
 <211> 962  
 <212> DNA  
 20 <213> Archaeoglobus fulgidus  
 25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(956)  
 30 <223>  
 35 <400> 34  
 cc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg gcc gaa ata atc aac aaa 47  
 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Thr Asn Lys  
 1 5 10 15  
 40 gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag ccg att gga ctc tac aaa 95  
 Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys  
 20 25 30  
 gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc aag agg cta agg cct gta  
 45 Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val 143  
 35 40 45  
 at a agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg aaa gac tac aga aag att 191  
 Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile  
 50 50 55 60  
 atc ccg gct gtc agc att gaa aca atc cac aac ttc acc ctc gtg  
 Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val 239  
 65 70 75  
 55 cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg agg agg gga gtt ccg acg  
 His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr 287  
 80 85 90 95  
 60 gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc att tta gca ggc gac aca 335  
 Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr  
 100 105 110  
 65 ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca aag tgc gat gtt gag agc 383  
 Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser  
 115 120 125  
 70 gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt tcg gac gtt tgc ata aaa 431  
 Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys  
 130 135 140

ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc ttt gag aaa aag gag agc Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser 145 150 155	479
5 gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc gag ctg aag acc gga gtg Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val 160 165 170 175	527
10 ctg att gca gct tct gca gca tta cct gcg gtg ctt ttt ggg gag agc Leu Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser 180 185 190	575
15 gag gaa att gta aag gcg ctg tgg gac tac gga gtt ctt agc ggt att Glu Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile 195 200 205	623
20 ggc ttc cag atc cag gac gac ctg ctt gac ctg act gag gag acc gga Gly Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly 210 215 220	671
25 aag gac tgg gga agc gac ctg ctt aaa ggg aag aaa acc ctg att gtc Lys Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val 225 230 235	719
30 ata aag gcg ttc gaa aag gga gtg aag cta aag acg ttt gga aag gaa Ile Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu 240 245 250 255	767
35 aag gcg gac gtc tct gag att aga gat gat atc gaa aag tta aga gag Lys Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu 260 265 270	815
40 tgt ggt gcg att gat tac gct gcc agc atg gca aga aag atg gct gaa Cys Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu 275 280 285	863
45 gag gcg aaa aga aag ctc gaa gtt ctg cct gaa agc aaa gcc aag gaa Glu Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu 290 295 300	911
50 aca ctg ctg gaa ctt acc gac ttc ttg gtt aca aga aaa aag tga Thr Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys 305 310 315	956
55 aagctt	962
60 <210> 35	
65 <211> 317	
70 <212> PRT	
75 <213> Archaeoglobus fulgidus	
80 <400> 35	
85 Met. Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala 1 5 10 15	
90 Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala 20 25 30	
95 Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile 35 40 45	

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
 50 55 60

5 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
 65 70 75 80

10 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
 85 90 95

15 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu  
 100 105 110

20 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
 115 120 125

25 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
 130 135 140

30 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
 145 150 155 160

35 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
 165 170 175

40 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
 180 185 190

45 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
 195 200 205

50 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
 210 215 220

55 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
 225 230 235 240

60 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
 245 250 255

65 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
 260 265 270

70 Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
 275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
 290 295 300

Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
 305 310 315

<210> 36  
 <211> 1293  
 5 <212> DNA  
 <213> Archaeoglobus fulgidus  
 10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (206)..(1159)  
 <223>  
 20 <400> 36  
 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtacccgg 60  
 ● gccccccctc gacgcccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg attgacgtga 120  
 25 gggggcaggg atggctataat ttctgggagc gaactccggg cgaggatcta gttgttaggga 180  
 gggattcatg acaccacaaa cagcc atg gtg aag gag gaa ata gcg aaa agg 232  
 30 Met Val Lys Glu Glu Ile Ala Lys Arg  
 1 5  
 gcc gaa ata atc aac aaa gcc att gaa gag ctt ctg ccc gaa agg gag 280  
 Ala Glu Ile Ile Asn Lys Ala Ile Glu Glu Leu Leu Pro Glu Arg Glu  
 10 15 20 25  
 35 ccg att gga ctc tac aaa gcc gca agg cat ctg atc aaa gca ggt ggc 328  
 Pro Ile Gly Leu Tyr Lys Ala Ala Arg His Leu Ile Lys Ala Gly Gly  
 30 35 40  
 40 aag agg cta agg cct gta ata agc ctc tta gca gtc gaa gcc ctt ggg 376  
 Lys Arg Leu Arg Pro Val Ile Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly  
 45 45 50 55  
 45 aaa gac tac aga aag att atc ccg gct gtc agc att gaa aca atc 424  
 Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile  
 60 65 70  
 50 cac aac ttc acc ctc gtg cat gac gac ata atg gac agg gac gag atg 472  
 His Asn Phe Thr Leu Val His Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met  
 75 80 85  
 55 agg agg gga gtt ccg acg gta cac agg gtt tat ggg gaa gcg acg gcc 520  
 Arg Arg Gly Val Pro Thr Val His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala  
 90 95 100 105  
 att tta gca ggc gac aca ctc ttt gct gaa gcc ttc aag ctg ctg aca 568  
 Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr  
 110 115 120  
 60 aag tgc gat gtt gag agc gag gga atc aga aaa gct aca gaa atg ctt 616  
 Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu  
 125 130 135  
 65 tcg gac gtt tgc ata aaa ata tgc gag ggg cag tac tac gac atg agc 664  
 Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser  
 140 145 150  
 70 ttt gag aaa aag gag agc gtt tcc gag gag gag tat ctc agg atg gtc 712  
 Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val  
 155 160 165

gag	ctg	aag	acc	gga	gtg	ctg	att	gca	gct	tct	gca	gca	tta	cct	gcg	760	
Glu	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala		
170					175					180					185		
5																	
gtg	ctt	ttt	ggg	gag	agc	gag	gaa	att	gta	aag	gcg	ctg	tgg	gac	tac	808	
Val	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Lys	Ala	Leu	Trp	Asp	Tyr		
									195				200				
10																856	
gga	gtt	ctt	agc	ggt	att	ggc	ttc	cag	atc	cag	gac	gac	ctg	ctt	gac		
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Phe	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Leu	Leu	Asp		
								210					215				
15																904	
ctg	act	gag	gag	acc	gga	aag	gac	tgg	gga	agc	gac	ctg	ctt	aaa	ggg		
Leu	Thr	Glu	Glu	Thr	Gly	Lys	Asp	Trp	Gly	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Gly		
					220			225				230					
20																952	
aag	aaa	acc	ctg	att	gtc	ata	aag	gcg	ttc	gaa	aag	gga	gtg	aag	cta		
Lys	Lys	Thr	Leu	Ile	Val	Ile	Lys	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu		
					235			240				245					
25																	
aag	acg	ttt	gga	aag	gaa	aag	gcg	gac	gtc	tct	gag	att	aga	gat	gat	1000	
Lys	Thr	Phe	Gly	Lys	Glu	Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Glu	Ile	Arg	Asp	Asp		
					250			255			260			265			
30																1048	
atc	gaa	aag	tta	aga	gag	tgt	ggt	gcg	att	gat	tac	gct	gcc	agc	atg		
Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Glu	Cys	Gly	Ala	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ser	Met		
					270			275			280			285			
35																1096	
gca	aga	aag	atg	gct	gaa	gag	gac	aaa	aga	aag	ctc	gaa	gtt	ctg	cct		
Ala	Arg	Lys	Met	Ala	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Leu	Pro		
					285			290				295					
40																1144	
gaa	agc	aaa	gcc	aag	gaa	aca	ctg	ctg	gaa	ctt	acc	gac	ttc	ttg	gtt		
Glu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Thr	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Asp	Phe	Leu	Val	
					300			305				310					
45																	
aca	aga	aaa	aag	tga	aagcttcaat	tgcatgctct	agatgatcaa	agaattcctg								1199	
Thr	Arg	Lys	Lys														
				315													
50																	
gcctagtcta	taggaggttt	tgaaaagaaa	ggagcaataa	tcattttctt	gttctatcaa											1259	
55																	
gagggtgcta	ttgctccttt	ctttttttct	cgag													1293	
60																	
<210>	37																
<211>	317																
<212>	PRT																
<213>	Archaeoglobus fulgidus																
65																	
<400>	37																
Met	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Ala	Glu	Ile	Ile	Asn	Lys	Ala		
1					5					10			15				
65																	
Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Glu	Pro	Ile	Gly	Leu	Tyr	Lys	Ala		
					20			25				30					
70																	
Ala	Arg	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Lys	Arg	Leu	Arg	Pro	Val	Ile		
					35			40			45						

Ser Leu Leu Ala Val Glu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Arg Lys Ile Ile  
 50 55 60

5 Pro Ala Ala Val Ser Ile Glu Thr Ile His Asn Phe Thr Leu Val His  
 65 70 75 80

10 Asp Asp Ile Met Asp Arg Asp Glu Met Arg Arg Gly Val Pro Thr Val  
 85 90 95

15 His Arg Val Tyr Gly Glu Ala Thr Ala Ile Leu Ala Gly Asp Thr Leu  
 100 105 110

20 Phe Ala Glu Ala Phe Lys Leu Leu Thr Lys Cys Asp Val Glu Ser Glu  
 115 120 125

25 Gly Ile Arg Lys Ala Thr Glu Met Leu Ser Asp Val Cys Ile Lys Ile  
 130 135 140

30 Cys Glu Gly Gln Tyr Tyr Asp Met Ser Phe Glu Lys Lys Glu Ser Val  
 145 150 155 160

35 Ser Glu Glu Glu Tyr Leu Arg Met Val Glu Leu Lys Thr Gly Val Leu  
 165 170 175

40 Ile Ala Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ala Val Leu Phe Gly Glu Ser Glu  
 180 185 190

45 Glu Ile Val Lys Ala Leu Trp Asp Tyr Gly Val Leu Ser Gly Ile Gly  
 195 200 205

50 Phe Gln Ile Gln Asp Asp Leu Leu Asp Leu Thr Glu Glu Thr Gly Lys  
 210 215 220

55 Asp Trp Gly Ser Asp Leu Leu Lys Gly Lys Lys Thr Leu Ile Val Ile  
 225 230 235 240

60 Lys Ala Phe Glu Lys Gly Val Lys Leu Lys Thr Phe Gly Lys Glu Lys  
 245 250 255

65 Ala Asp Val Ser Glu Ile Arg Asp Asp Ile Glu Lys Leu Arg Glu Cys  
 260 265 270

Gly Ala Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Met Ala Arg Lys Met Ala Glu Glu  
 275 280 285

Ala Lys Arg Lys Leu Glu Val Leu Pro Glu Ser Lys Ala Lys Glu Thr  
 290 295 300

65 Leu Leu Glu Leu Thr Asp Phe Leu Val Thr Arg Lys Lys  
 305 310 315

5 <210> 38  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
10 <220>  
<221> primer\_bind  
15 <222> (1)..(35)  
<223>  
  
20 <400> 38  
gagctttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc 35  
  
25 <210> 39  
<211> 38  
<212> DNA  
30 <213> Künstliche Sequenz  
  
35 <220>  
<221> Primer  
40 <222> (1)..(38)  
<223>  
  
45 <400> 39  
aagcttgggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact 38  
  
50 <210> 40  
<211> 647  
<212> DNA  
55 <213> Arabidopsis thaliana  
  
60 <220>  
<221> Promotor  
<222> (1)..(647)  
65 <223>  
  
70 <400> 40  
gagctttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgt 60

	taataacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagcttttg tagttgaatt	120
5	tctctggctg atctttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat	180
	ttgagcttct tttgaactat ttctgtataat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa	240
	actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gaggggaggga tgactccatg tcaaaataga	300
10	tgtcataaga ggcctcatcaa taagtgtttt agccctttag ctggccagt aactaccaga	360
	ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt tttgatgttag gactgaaatg tgaacaacag	420
15	gcgcatgaaa ggctaaatgg gacaaatgt aacgcgaaat aacttacccct ctctaaacact	480
	tggcctcaca ttggcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc	540
	tcccgctaat cttttttctt ttgatctttt ttttttgc tattatttt ttgactttga	600
20	tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac caagctt	647
	<210> 41	
25	<211> 28	
	<212> DNA	
30	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
35	<221> primer_bind	
	<222> (1)..(28)	
40	<223>	
45	<400> 41 gagctcaactc actgatttcc attgcttg	28
	<210> 42	
50	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
55	 	
	<220>	
60	<221> Primer	
	<222> (1)..(23)	
	<223>	
65	 	
	<400> 42 aagcttttgt tgaagagatt tgg	23
70		

```

<210> 43
<211> 37
5 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<221> primer_bind
15 <222> (1)..(37)
<223>

20 <400> 43
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

25 <210> 44
<211> 34
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(34)
40 <223>

45 <400> 44
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34

50 <210> 45
<211> 777
<212> DNA
55 <213> Arabidopsis thaliana

60 <220>
<221> Promotor
<222> (1)..(777)
65 <223>

70 <400> 45
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60

```

5	tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagtttg aaacaacact aactggtcga agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga ccaaacatta tctacaaaca aagactttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta ggggtaatat tctatccat aaggatctt agttaaaggc aaatccggga aattattgtt 10 atcatttggg gaaacatata aaagatttga gtttagatgga agtgacgatt aatccaaaca tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttt acaccaataat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttgc ttacttttag ggtaagtgc 15 aaaaagccaaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtgcgtgt ccgttgcattt aaacagtgtc ttgtatcaa aaaaatcagt ttacataat ggaaaatttt 20 tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cctttcatgg attaggcaat actttccatt tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctctt ctatccact tcttcttctt cattataatct cttgtcctctt ccacccaaatc tcttcaacaa aaagctt 25	120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 777
30	<210> 46 <211> 804 <212> DNA <213> Synechococcus WH8102	
35	<220>	
40	<221> CDS <222> (1)..(804) <223>	
45	<400> 46 atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 50 1 5 10 15	48
50	cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30	96
55	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45	144
60	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu 50 55 60	192
65	ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu 65 70 75 80	240
70	ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His 85 90 95	288

ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala 100 105 110	336
5 ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu 115 120 125	384
10 gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn 130 135 140	432
15 aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160	480
20 cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175	528
25 aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190	576
30 gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205	624
35 tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220	672
40 cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240	720
45 ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255	768
50 cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265	804
55 <210> 47	
60 <211> 267	
65 <212> PRT	
65 <213> Synechococcus WH8102	
70 <400> 47	
60 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15	
65 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30	
65 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45	

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

5 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

10 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

15 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

20 Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

25 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

30 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

35 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

40 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

45 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

50 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

55 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

60 <210> 48  
 <211> 804  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Variante

65 <220>

70 <221> CDS

<222> (1) .. (804)

<223>

5	<400> 48	
10	atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15	48
15	cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30	96
20	ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45	144
25	tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu 50 55 60	192
30	ttg att ggc agc ttg att ctg tgg cag acc ttt ctg cac acc ggg ctg Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu 65 70 75 80	240
35	ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His 85 90 95	288
40	ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala 100 105 110	336
45	ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu 115 120 125	384
50	gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn 130 135 140	432
55	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160	480
60	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175	528
65	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190	576
70	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205	624
75	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220	672
80	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240	720
85	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255	768

804

cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

5

&lt;210&gt; 49

10 &lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Künstliche Variante

15

&lt;400&gt; 49

20 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

25 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

25

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

30

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

35

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

40

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

45

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

50

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

55

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

60

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

65

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

70

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

5 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

10 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

15

&lt;210&gt; 50

20

&lt;211&gt; 804

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Variante

25

&lt;220&gt;

30

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(804)

35

<400> 50  
 atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48  
 Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

40

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96  
 Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
 20 25 30

45

ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc 144  
 Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

50

tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag aag cct ggg ctg 192  
 Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

55

ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg 240  
 Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

60

ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat 288  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

65

ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca 336  
 Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac gga 384  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125

70 cat cct ggt act gat tta gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac 432

His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

5	aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met 145 150 155 160	480
10	cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu 165 170 175	528
15	aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser 180 185 190	576
20	gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr 195 200 205	624
25	tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr 210 215 220	672
30	cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn 225 230 235 240	720
35	ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe 245 250 255	768
40	cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr 260 265	804
45	<210> 51	
50	<211> 267	
	<212> PRT	
	<213> Künstliche Variante	
55	<400> 51	
	Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His 1 5 10 15	
	Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala 20 25 30	
60	Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu 35 40 45	
65	Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu 50 55 60	
70	Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu 65 70 75 80	
	Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His 85 90 95	

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110  
 5  
 Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Gly  
 115 120 125  
 10 His Pro Gly Thr Asp Leu Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140  
 15 Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160  
 20 Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175  
 Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190  
 25 Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205  
 30 Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220  
 35 Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240  
 40 Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255  
 Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265  
 45 <210> 52  
 50 <211> 690  
 <212> DNA  
 <213> Nodularia spumigena NSOR10  
 55  
 <220>  
 60 <221> CDS  
 <222> (1)...(690)  
 <223>  
 65  
 <400> 52  
 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 70 1 5 10 15 48

ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu 20 25 30	96
5 ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 35 40 45	144
10 gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His 50 55 60	192
15 ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln 65 70 75 80	240
20 aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa Lys Leu Leu Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Glu 85 90 95	288
25 aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa aac ttt ttt gct tgg Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp 100 105 110	336
30 tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg tta caa att atc aca Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr 115 120 125	384
35 tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata tgg cat ttt cca gag Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu 130 135 140	432
40 gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca att tta agt tct tta Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu 145 150 155 160	480
45 caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac agt gag cct gta gaa Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu 165 170 175	528
50 ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att agc cgt ccc att tgg Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp 180 185 190	576
55 tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat cat tac gaa cat cat Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His 195 200 205	624
60 gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca gaa att tat aaa atg Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met 210 215 220	672
65 tct aaa tca aat ttg tga Ser Lys Ser Asn Leu 225	690
70 <210> 53	
60 <211> 229	
65 <212> PRT	
65 <213> Nodularia spumigena NSOR10	
70 <400> 53	

Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

5 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

10 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

15 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

20 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

25 Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

30 Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

35 Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

40 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

45 Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190

50 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205

55 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220

Ser Lys Ser Asn Leu  
 225

60 <210> 54

<211> 37

65 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 5 <222> (1)..(37)  
 <223>  
 10 <400> 54 37  
 gcgcatgcat ctagaaatga tccagttttaga acaacca  
 15 <210> 55  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 20 <213> Künstliche Sequenz  
 25 <220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(37)  
 30 <223>  
 35 <400> 55 37  
 gcgcatgctc tagactattt tgctttgtaa atttctg  
 40 <210> 56  
 <211> 792  
 <212> DNA  
 45 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133  
 50 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (5)..(775)  
 55 <223>  
 60 <400> 56 49  
 gcgc atg cat cta gaa atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa  
 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln  
 1 5 10 15  
 65 gca aaa ctg act cca gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt 97  
 Ala Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu  
 20 25 30  
 70 ttc att gct att gtc att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta 145

	Phe Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu			
	35	40	45	
5	tta ctt tcc ctt gac atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct		193	
	Leu Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro			
	50	55	60	
10	gtt ata cta tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct		241	
	Val Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser			
	65	70	75	
15	cat gat gcc atg cat ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat		289	
	His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn			
	80	85	90	95
20	cat ttg att gga aca ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat		337	
	His Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr			
	100	105	110	
25	caa aaa cta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc		385	
	Gln Lys Leu Leu Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser			
	115	120	125	
30	tca ata gac ccg gat ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct		433	
	Ser Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala.			
	130	135	140	
35	tgg tat ttt cat ttt atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att		481	
	Trp Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile			
	145	150	155	
40	gcg ttg act att att tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca		529	
	Ala Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro			
	160	165	170	175
45	agt gat aat cta act tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca		577	
	Ser Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser			
	180	185	190	
50	tta caa tta ttc tat ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata		625	
	Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile			
	195	200	205	
55	ggg ggt tat gtt cag cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att		673	
	Gly Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile			
	210	215	220	
60	tgg tgg tca ttt atc acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat		721	
	Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His			
	225	230	235	
65	cac gaa tat cct cat att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa		769	
	His Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys			
	240	245	250	255
70	gca aaa tagtctagag catgcgc		792	
	Ala Lys			
75	<210> 57			
	<211> 257			
	<212> PRT			
	<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133			

&lt;400&gt; 57

5 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala  
 1 5 10 15

10 Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe  
 20 25 30

15 Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val  
 50 55 60

20 Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His  
 65 70 75 80

25 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His  
 85 90 95

30 Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 100 105 110

35 Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser  
 115 120 125

Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp  
 130 135 140

40 Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala  
 145 150 155 160

45 Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser  
 165 170 175

50 Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly  
 195 200 205

55 Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 210 215 220

60 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
 225 230 235 240

65 Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala  
 245 250 255

70 Lys

```
    <210> 58
5    <211> 26
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz
10

    <220>
15    <221> Primer
    <222> (1)..(26)
    <223>
20

    <400> 58
25    gtcgaccctg ctttaatgag atatgc
    <210> 59
    <211> 27
30    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz
35

    <220>
    <221> Primer
40    <222> (1)..(27)
    <223>
45

    <400> 59
47    ctcgagcttg gacaatcagt aaattga
    <210> 60
50    <211> 210
    <212> DNA
55    <213> Agrobacterium tumefaciens
    <220>
60    <221> Terminator
    <222> (1)..(210)
    <223>
65

70
```

5	<400> 60 gtcgaccctg ctttaatgag atatgcgaga cgccatgtat cgcatgatat ttgcattcaa ttctgttgta cacgttgtaa aaaacctgag catgtgttagc tcagatcctt accgcccgtt tcggttcatt ctaatgaata tatcaccgt tactatcgta ttttatgaa taatattctc cggtcaattt actgattgtc caagctcgag	60 120 180 210
10	<210> 61	
	<211> 37	
15	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
20	<220>	
	<221> Primer	
25	<222> (1)..(37)	
	<223>	
30	<400> 61 cccgaaaatt cttcatttt tcgattttga ttctgtg	37
35	<210> 62	
	<211> 38	
40	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
45	<220>	
	<221> Primer	
50	<222> (1)..(38)	
	<223>	
55	<400> 62 aagcttggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact	38
60	<210> 63	
	<211> 652	
	<212> DNA	
65	<213> Arabidopsis thaliana	
70	<220>	

<221> Promotor  
 <222> (1)..(652)  
 5 <223>  
  
 10 <400> 63  
 cccgggaatt cttcatttatt tcgattttga tttcggtgacc agcgaacgca gaataccttg 60  
 ttgtgtataa ctttacccgt gtaaatcaaa aacaaaaagg cttttgagct tttttagtt 120  
 15 gaatttctct ggctgtatctt ttctgtacag attcatatat ctgcagagac gatatcattg 180  
 attatttgag cttcttttga actatttcgt gtaatttggg atgagagctc tatgtatgtg 240  
 tgtaaaactt gaagacaaca agaaaggtaa caagtgaggg agggatgact ccatgtcaaa 300  
 20 atagatgtca taagaggccc atcaataagt gcttgagccc attagctagc ccagtaacta 360  
 ccagattgtg agatggatgt gtgaacagtt ttttttttga tgttaggactg aaatgtgaac 420  
 25 aacaggcgca taaaaggcta aattaggaca atgataagca gaaataactt atcctctcta 480  
 acacttggcc tcacattgcc cttcacacaa tccacacaca tccaaatcaca acctcatcat 540  
 atatctcccg ctaatctttt tttctttgat cttttttttt ttgcttattt tttttttgac 600  
 30 tttgatctcc catcagttca tcttcttctt cttcttctga tcaaccaagc tt 652  
  
 <210> 64  
 35 <211> 29  
 <212> DNA  
 40 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 45 <221> Primer  
 <222> (1)..(29)  
 50 <223>  
  
 55 <400> 64  
 gagctctagc gcaatcttat gtggtaaaa 29  
  
 <210> 65  
 60 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 65 <220>  
 <221> Primer  
 70

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt;

5

<400> 65  
aagctttct taaaatgtaaa gattgagtc

29

10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1773

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Petunia hybrida

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Promotor

25 &lt;222&gt; (1)..(1773)

&lt;223&gt;

30

<400> 66  
gagctcttagc gcaatcttat gtggcacaaa tcttgattag tcggaaaaaa atgatgtggc 60

35 cctacaaatg gttggaggat gggagattt gctctatcta gagttatgtg gttgttgaag 120

catgggtta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

gacaattacg taaaatgttat gggttgtttt gtctatttt gtcgaggcct ttctttcct 240

40 tccaggttgt tgaagatggc ccaattcgat tagaataatg tttttagctt tagcatattc 300

tctctcggtt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttt acacataat 360

45 ttttatttct ctccatttac ttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg 420

tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct 480

actaacatat actagtaaag agaatattaa catggcacat ataattttagt gcaaaatgag 540

50 tatgatgaaa tttaaaccctt aaatctcttg atttttagtgc acgttgcaccc 600

taataagtca tggtagtgc gcagaaagac aaactcatcc accaactgtt tagcaataaa 660

55 aaatagaaga atcttccttg ggcaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaat 720

ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgtt acagtgcataa ttaaataact 780

taattgtatt agatatttct tgcacccaaa aaattaaaa actgaaaaaaa ggttagcaatc 840

60 aaaataaaca aaaggacaaa ataagtggaaa ggtacagccca ccaaccctgg cggctcactg 900

tttgggtt aaaacgtaga cttacaccta cccaaatcta caactaaaat gaggcaataa 960

65 tactttgccc aaaattacca agaaaaaaa aagaaaaggaa tcccttaata ttactctcct 1020

ccatttcaca ataaatatcc tagttgact taaatttagat tttaaaaat gaaagacgac 1080

ttttaaaact tgtaatctaa aataaatcat agttaaatgt gtggctataa atcattgtat 1140

70 taacggtaaaa gtggtaagtt taaaatgttttcaaa atataaaaatt gtactatcat 1200

5	tctttttgga atggactaat aagaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggagttac	1260
	tccttttaac aataacctt gtccttcaa ttcaattatc agtatgaaa cattaaaaat	1320
10	tattattgtat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgctttc	1380
	cagggcacaca ttcaaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattcca gacttcttg	1440
15	tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcgaa ttaacttcga attagtcgag	1500
	cccaaataaa tatatacgtc gggtgaaaaa ctataaaatg tttgacaaaa atgtcaaatt	1560
20	aatatatcaa tctgcaacaa ccttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttacaaag	1620
	gtagttggtg aagctagtca gcgaatccca ttaccttcca ctctacctaa cccccttcac	1680
	caacaacaaa tttctgtaat ttaaaaacta gccaaaaaaag aactctcttt tacaaagagc	1740
25	caaagactca atctttactt tcaagaaaaag ctt	1773
	<210> 67	
30	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
35	<220>	
40	<221> Primer	
	<222> (1)..(39)	
45	<223>	
	<400> 67	
	gcgcatgcat ctagaaatga atttttgtga taaaccagt	39
50	<210> 68	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
55	<220>	
60	<221> Primer	
	<222> (1)..(37)	
65	<223>	
	<400> 68	
	gcgcatgctc tagattacga attggttact gaattgt	37
70		

<210> 69  
 <211> 819  
 5 <212> DNA  
 <213> *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

10 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (5)..(802)  
 <223>

20 <400> 69  
 gcgc atg cat cta gaa atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat 49  
 Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 25 gtt gca ata gag caa tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg 97  
 Val Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu  
 20 25 30  
 30 gtg att gtc ata gta att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt 145  
 Val Ile Val Ile Val Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe  
 35 40 45  
 35 tta cta gct att aat tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att 193  
 Leu Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile  
 50 55 60  
 40 gca ata gtt tgg caa atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca 241  
 Ala Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala  
 65 70 75  
 45 cat gat gct atg cat ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat 289  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn  
 80 85 90 95  
 50 aat ttt atc ggt tca cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat 337  
 Asn Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr  
 100 105 110  
 55 caa cag atg tta aag aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc 385  
 Gln Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser  
 115 120 125  
 60 tgg tat ctc cat ttc atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata 481  
 Trp Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile  
 145 150 155  
 65 gta cta act atc cta ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat 529  
 Val Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His  
 160 165 170 175  
 70 caa ata aat ctc atc tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc 577  
 Gln Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 70 att caa ctg ttt tat ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag 625

195	200	205		
5	aaa gga tat gtt tat ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act Lys Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr 210 215 220		673	
10	ttt ttg tca ttt atc gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat Phe Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His 225 230 235		721	
15	cat gag tat ccc cat gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys 240 245 250 255		769	
20	cag aga gta ttc aac aat tca gta acc aat tcg taatctagag catgcgc Gln Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser 260 265		819	
25	<210> 70			
25	<211> 266			
25	<212> PRT			
	<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133			
30	<400> 70			
35	Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val 1 5 10 15			
35	Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val 20 25 30			
40	Ile Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu 35 40 45			
45	Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala 50 55 60			
50	Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 65 70 75 80			
55	Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn 85 90 95			
55	Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln 100 105 110			
60	Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu 115 120 125			
65	Val Asp Pro Asp Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp 130 135 140			
70	Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val 145 150 155 160			

Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln  
165 170 175

5

Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile  
180 185 190

10

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys  
195 200 205

15

Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe  
210 215 220

20

Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
225 230 235 240

25

Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln  
245 250 255

30

Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
260 265

35

<210> 71

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

45

<221> Primer

<222> (1)...(33)

<223>

50

<400> 71  
gcgcatgcat ctagaaatgg cgatcgccat tat 33

55

<210> 72

<211> 32

60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

65

<220>

<221> Primer

&lt;222&gt; (1)...(32)

&lt;223&gt;

5

<400> 72  
gcgcatgctc tagatcacaa atttgattta ga

32

10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 720

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (5)...(703)

&lt;223&gt;

30

<400> 73  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc  
Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile  
1 5 10 15

49

35

agc cta ggt ttg tta ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg  
Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp  
20 25 30

97

40

atg ttg tta ccg ctc ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta  
Met Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu  
35 40 45

145

45

ttt att aca gct cat gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat  
Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn  
50 55 60

193

50

ccc aaa atc aac cat ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt  
Pro Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly  
65 70 75

241

55

ctt tta cct tat caa aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat  
Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His  
80 85 90 95

289

60

aat cca gcc agt gaa aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa  
Asn Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys  
100 105 110

337

65

aac ttt ttt gct tgg tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg  
Asn Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp  
115 120 125

385

70

tta caa att atc aca tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata  
Leu Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile  
130 135 140

433

tgg cat ttt cca gag gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca  
Trp His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser  
145 150 155

481

5	att tta agt tct tta caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac Ile Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His 160 165 170 175	529
10	agt gag cct gta gaa ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att Ser Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile 180 185 190	577
15	agc cgt ccc att tgg tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr 195 200 205	625
20	cat tac gaa cat cat gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca His Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro 210 215 220	673
25	gaa att tat aaa atg tct aaa tca aat ttg tgatctagag catgcgc Glu Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu 225 230	720
30	<210> 74	
35	<211> 233	
40	<212> PRT	
45	<213> Nodularia spumigena NSOR10	
50	<400> 74	
55	Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser 1 5 10 15	
60	Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met 20 25 30	
65	Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe 35 40 45	
70	Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro 50 55 60	
75	Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu 65 70 75 80	
80	Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Asn 85 90 95	
85	Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn 100 105 110	
90	Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu 115 120 125	
95	Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp 130 135 140	

His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile  
145 150 155 160

5 Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser  
165 170 175

10 Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser  
180 185 190

15 Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His  
195 200 205

20 Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu  
210 215 220

25 Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
225 230

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/008624

International filing date: 31 July 2004 (31.07.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: PCT/EP/03/09106  
Filing date: 18 August 2003 (18.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 January 2005 (24.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**